

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Rostlinné biotechnologie

Zadávací katedra: Katedra rostlinné výroby

Téma diplomové práce:

**Vliv faktorů vnějšího prostředí na vývoj průduchů v
epidermis *Arabidopsis thaliana* - přenos signálu.**

Autor práce: Bc. Irena Jelínková

Vedoucí práce: Ing. Marie Hronková, Ph.D.

2013

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Datum: 26. 4. 2013

Podpis studenta:

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí práce doktorce Marii Hronkové za skvělé vedení, ochotu a trpělivost. Mé díky dále patří doc. Jiřímu Šantrůčkovi za ochotu a cenné rady, Ing. Daně Wiesnerové za její pomoc a rady při pokusech, Mgr. Láďovi Markovi za provedení izotopových analýz a zbytku řešitelského týmu „průduchového grantu“ za celkovou podporu. Nemalý dík patří Vláďovi Hoštičkovi za psychickou podporu a pomoc při problémech s PC, tatškovi za připomínky k úpravě textu a zbytku rodiny za podporu. Tato práce byla vypracována díky podpoře grantu Grantové agentury ČR GAP501/12/1261.

Abstrakt

Funkce průduchů a geneticky založená regulace jejich počtu je zajímavým a důležitým předmětem výzkumu. Hustota průduchů na listech rostlin je ovlivněna také vnějšími faktory prostředí, např. koncentrací CO_2 v atmosféře a ozářeností fotosynteticky účinným zářením (PAR). Tyto dva faktory mají společný efekt – mohou změnit vnitřní koncentraci CO_2 v listu (C_i). Nabízí se proto otázka, zda vnitřní koncentrace CO_2 nemůže být signálem pro expresi genů řídících vývoj průduchů na listu. Podle hypotézy, na jejímž základě vznikla tato diplomová práce, jsem očekávala, že v případě snížení C_i dojde ke zvýšení exprese pozitivního regulátoru hustoty průduchů na listu *STOMAGENU*. U rostlin, kterým byla vnitřní koncentrace CO_2 snížena pomocí zvýšené ozářenosti byla exprese stomagenu zvýšená. U rostlin, kde však byla vnitřní koncentrace CO_2 snížena přidáním kyseliny abscisové do živného roztoku nebyl zjištěn žádný efekt na expresi stomagenu. Z výsledku těchto pokusů tedy vyplývá, že exprese *STOMAGENU* není ovlivněna vnitřní koncentrací CO_2 .

Klíčová slova:

Průduchy, CO_2 , světlo, ABA, *STOMAGEN*

Summary

The stomatal function and genetically based regulation of their number are interesting and important subjects of scientific research. Stomatal density on plant leaf surface is affected also by environmental factors, e.g. atmospheric CO₂ concentration and irradiance (PAR). These two factors have common affect – leaf internal CO₂ concentration (C_i) in the leaf can be changed. The question might be if the C_i is the signal for expression of genes controlling stomatal development. According to the hypothesis which this thesis is based on I proposed an increase of expression of positive regulator *STOMAGEN* in the case when C_i is reduced. The expression of *STOMAGEN* was increased in plants with C_i decreased by higher PAR in contrast with plants where the C_i was decreased by adding of abscisic acid into nutrient solution. These results show no dependence of *STOMAGEN* expression on inner CO₂ concentration.

Key words:

Stomata, CO₂, light, ABA, *STOMAGEN*

Obsah

1.	MOTIVACE A CÍLE PRÁCE	7
2.	ÚVOD	8
3.	TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1	PRŮDUCHY A JEJICH VÝVOJ V EPIDERMIS <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	9
3.1.1	<i>Průduchy</i>	9
3.1.2	<i>Funkce průduchů</i>	9
3.1.3	<i>Vývoj průduchů v epidermis</i>	11
3.1.4	<i>Základní regulace vývoje průduchů na molekulární úrovni (modelová rostlina <i>Arabidopsis thaliana</i> L.)</i>	12
3.2	FAKTORY VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ A JEJICH VLIV NA VÝVOJ PRŮDUCHŮ	19
3.2.1	<i>Koncentrace CO₂ v atmosféře</i>	20
3.2.2	<i>Fotosynteticky aktivní záření (kvantita a kvalita)</i>	21
3.2.3	<i>Vlhkostní podmínky</i>	22
3.3	KYSELINA ABCISOVÁ.....	22
3.4	STABILNÍ IZOTOPY UHLÍKU V ROSTLINÁCH – VYUŽITÍ VE FYZIOLOGII ROSTLIN	23
3.5	INFRAČERVENÁ TERMOGRAFIE – VYUŽITÍ VE FYZIOLOGII ROSTLIN	24
4.	MATERIÁL A METODY	25
4.1	PODMÍNKY PĚSTOVÁNÍ ROSTLIN	25
4.2	ANALÝZA EXPRESE GENŮ	26
4.3	STANOVENÍ POČTU PRŮDUCHŮ A PRŮDUCHOVÉHO INDEXU.	27
4.4	ANALÝZA STABILNÍCH IZOTOPŮ UHLÍKU, VNITŘNÍ KONCENTRACE CO ₂	28
4.5	IR TERMOGRAFIE	29
4.6	STATISTICKÁ ANALÝZA A GRAFICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT	29
5.	VÝSLEDKY	30
5.1	TERMOGRAFIE	30
5.2	VNITŘNÍ KONCENTRACE CO ₂	31
5.3	POČET PRŮDUCHŮ NA LISTECH	34
5.4	RELATIVNÍ EXPRESE STOMAGENU	36
5.5	KORELACE MEZI VNITŘNÍ KONCENTRACÍ CO ₂ A RELATIVNÍ EXPRESÍ <i>STOMAGENU</i>	38
6.	DISKUZE	40
7.	ZÁVĚR	45
8.	PŘÍLOHY	46
9.	LITERATURA	50

1. Motivace a cíle práce

S objevením prvního pozitivního regulátoru počtu průduchů na listu huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) – *STOMAGENu*, vyvstalo množství dalších otázek. Jednou z nich by mohlo být hledání signálu, který spouští expresi *STOMAGENu* a tím zvyšuje počet průduchů na listu. Již dlouho je známo, že hustota průduchů na listu je ovlivňována vnějšími faktory prostředí, např. intenzitou fotosynteticky aktivního záření, koncentrací CO₂ v atmosféře. Tyto dva faktory mají jeden společný efekt – mohou změnit koncentraci CO₂ uvnitř listu. V případě zvyšující se ozáření rostlin se urychluje proces fotosyntézy a uvnitř listu dochází k rychlé spotřebě molekul CO₂ a jejich koncentrace v listu klesá podobně jako v případě snížení koncentrace CO₂ v atmosféře nebo třeba přivřením průduchů pomocí aplikace kyseliny abscisové (ABA).

Hypotéza

Signálem, který spouští expresi *STOMAGENu* a zvyšuje hustotu průduchů na listu rostliny je vnitřní koncentrace CO₂.

Cíl práce

Cílem mé práce bylo zjistit, zda existuje spojitost mezi sníženou koncentrací CO₂ uvnitř listu a zvýšením exprese *STOMAGENu*, v souvislosti s navýšením počtu průduchů na listu modelové rostliny *Arabidopsis*.

2. Úvod

V poslední době roste počet šlechtitelských programů zaměřených na zvýšenou účinnost využití vody (WUE) při současném zachování či dokonce zvýšení výnosu, z důvodu ubývání povrchové i podzemní sladké vody v prostředí. Rostliny regulují výměnu plynů mezi vnitřním a vnějším prostředím a tedy i ztráty vody pomocí drobných pórů – průduchů. Rostlina je schopna řádově během několika minut měnit otevřenost těchto pórů a tím reagovat na momentální podmínky prostředí. V dlouhodobějším měřítku je pak schopná měnit velikost a množství průduchů utvářejících se na mladých listech. Proto je funkce průduchů a geneticky založená regulace jejich počtu zajímavým a důležitým předmětem výzkumu.

3. Teoretická část

3.1 Průduchy a jejich vývoj v epidermis *Arabidopsis thaliana*

3.1.1 Průduchy

Průduchy jsou drobné póry, díky nimž je umožněna řízená výměna plynů (zejména CO₂, H₂O, O₂) mezi vnitřním a vnějším prostředím listu. Objevují se na všech nadzemních částech rostliny, ale nejvíc se jich vyskytuje na listech. Sestávají ze dvou svěracích buněk, které ohraničují průduchovou štěrbinu. Pod každým průduchovým pórem se nachází velký intercelulární prostor, tzv. podprůduchová dutina. U mnoha rostlinných druhů se kolem svěracích buněk nacházejí epidermální buňky, které se morfologicky liší od ostatních epidermálních buněk. Tyto buňky nazýváme buňkami podpůrnými.

Rostlina může skrze průduchy velmi rychle ztrácet vodu. Regulace jejich funkce je proto pro život rostliny a její růst velmi důležitá. U rostlin se vyvinuly dva typy systémů regulujících funkci průduchů a jejich reakci na podmínky prostředí. Prvním typem je rychlý mechanismus otevírání a zavírání průduchů (Casson, Hetherington, 2010). Druhým typem je geneticky determinovaný a vnějším prostředím ovlivněný mechanismus zakládání průduchů, který ovlivňuje počet, velikost a rozmístění průduchů (Casson, Hetherington, 2010, Casson, Gray, 2008).

3.1.2 Funkce průduchů

Primární funkcí průduchů je optimalizovat výměnu CO₂ a vodní páry mezi mezibuněčnými prostory v listu a atmosférou při měnících se vnějších podmínkách. Velikost průduchové štěrbině a tím i výměna plynů je regulována turgorem svěracích buněk (Brownlee, 2001). Akumulace iontů (K⁺, Cl⁻, aniont kys. jablečné) v těchto buňkách zvyšuje osmotický tlak – snižuje vodní potenciál, čímž do nich začne proudit voda z okolního apoplastu, turgor buněk se zvyšuje a průduchová štěrbině se otevírá (Willmer, Fricker, 1996). Velikost průduchové štěrbině ovlivňuje mnoho vnitřních i vnějších environmentálních faktorů a může se měnit v čase v řádu sekund až hodin (Lawson, 2008). Podnětem k regulaci velikosti štěrbině může být

dostupnost vody v půdě, množství vodní páry a jiných plynů v atmosféře (např. CO₂, ozón, etylén, oxid dusnatý, oxid uhelnatý, H₂S), množství a spektrální složení dopadajícího světla aj. (Desikan, 2010).

Při stresu suchem se průduchy přivírají na základě poklesu turgoru svěřacích buněk, spojeného s výtokem draselných a chloridových iontů. Přivřením průduchy sníží transpiraci. Při extrémním stresu se dokonce uzavírají úplně (Brownlee, 2001). Některé experimenty ukázaly, že průduchy reagují citlivěji na vlhkost půdy, než na množství vody v listu. Toto nasvědčuje tomu, že průduchy jsou řízeny více chemickými signály (např. kyselinou abscisovou) z dehydratujících se kořenů, než vlhkostními poměry v listu, které jsou stále ještě konstantní (Chaves, *et al.*, 2002). Horko, pokud působí samostatně, má opačný účinek na chování průduchů. Při vysokých teplotách dochází k poškození fotosyntetického aparátu. V teplém a vlhkém prostředí se stomata široce otevírají a tak dochází k ochlazování listu. Naopak při nízkých teplotách mají tendenci se přivírat. Pokud je rostlina vystavena oběma stresovým faktorům současně (sucho i vysoká teplota), snaží se o kompromis mezi velkou ztrátou vody a ochranou před přehřátím, v extrémním případě dochází k otevření průduchů a rostlina obětuje vodu pro udržení příznivé teploty listu (Reynolds-Henne, *et al.*, 2010).

Dalším fyziologickým podnětem pro otevírání či zavírání průduchů je oxid uhličitý. Při nízkých koncentracích CO₂ se průduchy otevírají, při vysokých koncentracích se přivírají (Hashimoto, *et al.*, 2006; Israelson, *et al.*, 2006). Pohyby průduchů ovlivňuje i ozáření (tj. hustota toku fotosynteticky aktivních fotonů, PAR) a spektrální složení světla. Otevírají se po rozednění a na noc se opět zavřou. Problematice vývoje a pohybů průduchů v souvislosti s CO₂ a ozářeností bude věnována samostatná podkapitola.

Většina rostlinných druhů, u kterých byla studována anatomie průduchů, má ve svěřacích buňkách umístěné chloroplasty. Jejich průměrný počet je 10 – 15 na buňku (Humble, Raschke, 1971), zatímco u buněk palisádového parenchymu se jejich průměrný počet pohybuje okolo 30 – 70. Chloroplasty svěřacích buněk jsou často menší a méně granálně vrstvené, některé jsou hůře vyvinuté než ty, které se nacházejí v buňkách mezofylu. Ve tmě se v nich hromadí škrob, na světle opět mizí (u mezofylových buněk je to opačně). U některých rostlinných druhů to neplatí, například u *Arabidopsis thaliana* se škrob v chloroplastech akumuluje až během dne. Význam škrobu může spočívat v tom, že se rozštěpí na malát nebo cukry, které

fungují jako osmotikum, a tím průduchy otevírají. Další funkcí chloroplastů, která může být spojená s pohyby průduchů, je transport elektronů, který má za následek produkci ATP a / nebo cukrů, které jsou následně použity opět jako osmotikum (Lawson, 2008).

3.1.3 Vývoj průduchů v epidermis

Jak již bylo zmíněno, jiným (pomalejším) regulačním mechanismem, který ve výsledku ovlivňuje výměnu plynů v listu, je vývoj nových průduchů v nově vznikajících listech, jejich počet a uspořádání, které je dáno geneticky a modifikováno vnějšími podmínkami prostředí.

Každý průduch se vyvíjí z protodermální nediferencované buňky přes sérii asymetrických dělení v raném stádiu vývoje listu (Shimada, *et al.*, 2011). Nejdřív dojde k diferenciaci protodermální buňky na mateřskou buňku - meristemoidu (MMC), prekursoru průduchu. Ta následně podstupuje asymetrické dělení za vzniku malého trojúhelníkovitého meristemoidu a větší sesterské buňky. Toto dělení nazýváme vstupní, protože je na začátku série dělení vedoucích ke vzniku meristemoidu. Meristemoid se svými vlastnostmi podobá kmenové buňce, podstupuje další asymetrické dělení (většinou 1-3, ale i 6) a diferencuje se v mateřskou svěrací buňku (GMC), která se vyznačuje oválným tvarem, zeslabením buněčné stěny na protilehlých stranách buňky a zvýšenou akumulací škrobu (Von Groll, Altmann, 2001). Tato buňka se symetricky rozdělí a tím dá vznik páru svěracích buněk (GCs), ze kterých sestává průduch. Sesterská buňka meristemoidu je základní buňkou průduchové linie (SLGC) a podstupuje další asymetrické rozestupovací (spacing) dělení a vytvoří tak další satelitní meristemoid, který se nedotýká již existujícího průduchu. Jednotlivé průduchy se zpravidla nedotýkají jeden druhého – hovoříme o tzv. pravidle jedné vmezežené buňky („one cell spacing rule“). V raném stádiu vývoje listu téměř všechny buňky epidermis pocházejí z průduchových linií, a jak vývoj listu pokračuje, čím dál víc buněk z těchto linií vystupuje a stávají se dlaždicovými (epidermálními) buňkami (Shimada, *et al.*, 2011). Vývoj průduchů probíhá více méně v apikálně – bazálním směru, kdy dospělejší fáze průduchů se nacházejí u špičky. U jednoděložných rostlin je toto pravidlem, u dvouděložných to ale neplatí úplně, kvůli sesterským buňkám

meristemoidu (SLGC), které se mohou začít dělit později (Liu, Ohashi-Ito, Bergmann, 2009).

Regulace hustoty průduchů na listu a jejich pozice je řízena geneticky. Exprese příslušných genů odpovídá faktorům vnějšího prostředí, např. ozáření, koncentraci CO₂, vlhkostním podmínkám...

3.1.4 Základní regulace vývoje průduchů na molekulární úrovni (modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* L.)

Na první pohled vypadá rozmístění průduchů na listu *Arabidopsis* jako náhodné (v porovnání s uspořádáním průduchů např. na listech trav). Na pohled druhý je zřejmé, že jejich vývoj a konečné rozmístění je řízeno geneticky (Casson, Hetherington, 2010).

Sekreční peptidy

Správné rozmístění jednotlivých průduchů je důležité hlavně kvůli jejich správné funkci. Byly a stále jsou objevovány sekreční peptidy, které ovlivňují rozmístění a množství průduchů na listu. Jedná se o tzv. „cell-to-cell“ signální faktory, které přecházejí z jedné buňky do druhé a zajišťují správné rozmístění průduchů v rámci pravidla „jedné vmezežené buňky“ dva průduchy se nedotýkají navzájem, mezi nimi je alespoň jedna epidermální buňka (Peterson, Rychel, Torii, 2010; Kondo, *et al.*, 2010, Shimada, *et al.*, 2011; Vatén, Bergmann, 2012).

EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE (EPFL) je rodina cysteinem obohacených malých sekrečních peptidů, které na N-konci obsahují sekvenci pro sekreční signál a na C-konci 6 – 8 cysteinů, které tvoří intramolekulární disulfidické můstky (Rychel, Peterson, Torii, 2010). U šesti z těchto peptidů bylo zjištěno, že ovlivňují frekvenci a orientaci asymetrického dělení. Jsou to EPF1, EPF2, STOMAGEN a CHALLAH (Katsir, *et al.*, 2011) a EPFL4/EPFL5 (Abrash, Davies, Bergmann, 2011). Dva z těchto pravděpodobných ligandů – EPF1 a EPF2 jsou exprimovány výhradně v buňkách průduchové linie a negativně regulují hustotu průduchů na listu. U rostlin mutovaných v těchto genech je zvýšená hustota průduchů (Hara, *et al.*, 2007; Hunt, Gray, 2009; Shimada, *et al.*, 2011). Přesto, že

oba dva proteiny fungují prostřednictvím stejných receptorů, každý pracuje v odlišné fázi vývoje průduchu (Katsir, *et al.*, 2011).

Exprese *EPF1* běžně probíhá ve starších meristemoidech, mateřských buňkách svěřacích buněk a v mladých svěřacích buňkách (Rychel, Peterson, Torii, 2010) a reguluje rozestupovací dělení („spacing division“), při kterém vznikají satelitní meristemoidy (Shimada, *et al.*, 2011). Nejcharakterističtější defekt, který lze pozorovat u mutanta *epf1* je chybná orientace asymetrických dělení, což se projevuje dvojicemi, či skupinami (tzv. klastry) dotýkajících se průduchů. Při silné overexpresi tohoto genu dochází k naprostému potlačení průduchů na listech (Hara, *et al.*, 2007)

Gen *EPF2* je exprimován v protodermálních buňkách, které zatím neprošly dělením a řídí „rozhodnutí“ buňky zda zahájit asymetrické dělení nebo pokračovat ve vývoji jako buňka dlaždicová. Mutace tohoto genu se projevuje zvýšenou frekvencí asymetrických dělení (Katsir, *et al.*, 2011).

Dalším genem z rodiny *EPFL* je *EPFL9*, známý také jako *STOMAGEN* podle jeho pozitivní funkce („stomata generating“). Jeho overexprese zvyšuje hustotu průduchů na orgánech, které běžně průduchy tvoří a zvyšuje podíl klastrů na dospělých listech. Naopak snížení jeho účinnosti pomocí microRNA vede k redukci hustoty průduchů (Sugano, *et al.*, 2010; Kondo, *et al.*, 2010). Exprese genu přirozeně probíhá v nadzemních orgánech rostliny, nejvíce však v mladých vyvíjejících se listech (byl detekován již v listových primordiích). Zajímavé je, že na rozdíl od *EPF1* a *EPF2* není *STOMAGEN* exprimován v epidermis, ale v mezofylu listů (Kondo, *et al.*, 2010), je tedy pravděpodobné, že tento protein funguje jako signální molekula mezi mezofylem (fotosyntetickým pletivem) a epidermální vrstvou listu (Hamanishi, Thomas, Campbell, 2012). Výsledky některých pokusů naznačují, že funkce *STOMAGENU* není nijak závislá na přítomnosti *EPF1*, ale potřebuje inhibici asymetrického dělení zprostředkovanou *EPF2* (Sugano, *et al.*, 2010; Katsir, *et al.*, 2011). Zatím není zcela jasné na které receptory se *STOMAGEN* váže, je možné, že jeho funkce spočívá v kompetitivní vazbě na stejné receptory, na které se váží *EPF1* a *EPF2*. Předpokládá se, že ke své funkci vyžaduje přítomnost receptoru podobného proteinu, obsahujícího leucinem obohacené repetice, známého jako TMM (tento protein bude blíže specifikován dále v textu) (Katsir, *et al.*, 2011).

Čtvrtý gen z rodiny epidermálních faktorů je *EPFL6/CHALLAH (CHAL)*. Při vývoji průduchů působí tento protein jako represor (Abrash, Bergmann, 2010). Tento gen je exprimován hlavně v hypokotylu a ve stonku, ale ne v listech nebo dělohách,

z čehož se dá usuzovat, že zasahuje do orgánově specifické regulace vývoje průduchů (Shimada, *et al.*, 2011). Na základě zjištění fenotypových projevů overexprese, nebo naopak umlčení („silencing“) *CHAL* u rostlin mutovaných v genu *TMM* se má za to, že *CHAL* nepotřebuje tento gen ke své funkci (na rozdíl od jiných *EPF*). Spíše se zdá, že je jím inhibován (Abrash, Bergmann, 2010; Abrash, Davies, Bergmann, 2011).

Pravděpodobné receptory pro signální peptidy

System přenosu signálů z buňky do buňky u *Arabidopsis* zajišťuje charakteristické rozmístění průduchů a dlaždicových buněk a průduchů na povrchu listů podle již zmíněného pravidla jedné vmezeřené buňky. Tento systém zajišťují ligandy v podobě sekrečních peptidů a jejich receptory. Pravděpodobnými receptory pro signální peptidy jsou receptoru podobný membránový protein TOO MANY MOUTHS (*TMM*) a rodina receptorům podobných kináz *ERECTA* (*ERf*) (Shimada, *et al.*, 2011).

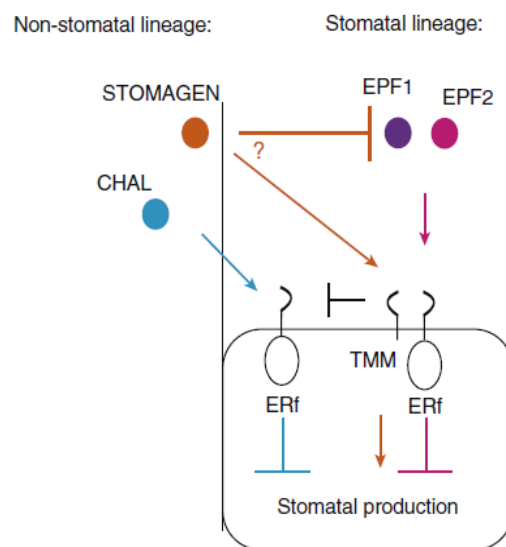
Gen *ERECTA* (*ER*) je již delší dobu znám jako jeden z faktorů ovlivňujících výšku rostliny a rezistenci k bakteriálním a houbovým chorobám (Godiard, *et al.*, 2003). Společně s geny *ERECTA-LIKE1* (*ERL1*) a *ERL2* ovlivňuje buněčnou proliferaci, řídí diferenciaci svěřacích buněk a vývoj vaječné buňky (Torii, *et al.*, 1996; Shpak, *et al.*, 2005). Shpak *et al.* (2005) uvádí, že mutantní rostliny pouze v jednom z těchto tří genů (např. *erl1*) nevykazují žádnou výraznou změnu v rozmístění průduchů, naproti tomu *erecta erl1 erl2* mutant vykazuje extrémní asymetrické dělení a nadměrně vysokou hustotu průduchových klastrů. Jednotlivé geny rodiny *ERECTA* tudíž spolupůsobí synergicky v zajištění komunikace mezi buňkami a ovlivnění směru vývoje daných buněk (Shpak, *et al.*, 2005; Rychel, Peterson, Torii, 2010).

TMM, receptoru podobný protein, je druhým pravděpodobným receptorem pro signální peptidy. U rostlin mutovaných v genu *TMM* (*tmm*) probíhá asymetrické dělení náhodně, dochází tedy k produkci průduchových klastrů. *TMM* tedy řídí orientaci a četnost asymetrických dělení potencionálních meristemoidů a vlastních meristemoidů (Nadeau, Sack, 2002).

Oba dva geny *TMM* i *ERECTA* (*ER*, *ERL* genová rodina) tedy řídí správné rozmístění průduchů na listu. *TMM* je receptoru podobný membránový protein

obsahující extracelulární doménu s repeticemi bohatými na leucin, který však nedisponuje intracelulární aktivní doménou. Naproti tomu ERECTA receptoru podobné kinázy (ERL) obsahují jak extracelulární doménu, tak i cytoplazmickou kinázovou doménu. Z toho se tedy usuzuje, že společně tvoří heterodimery, které přijímají a dál zprostředkovávají přenos signálu z buňky do buňky, ovlivňující diferenciaci průduchů (Nadeau, Sack, 2002; Torii, 2012).

Informace rozpoznaná na membráně buňky je přenášena prostřednictvím dalších z klíčových regulátorů vývoje průduchů, MAP kinázové kaskády (MAPK kaskáda). MAPK kaskády jsou tří-stupňové kinázové signální moduly, které hrají důležitou roli v přenosu signálu - informace (např. o reakci na stres) během růstu a vývoje rostlin (Wang, *et al.*, 2007). MAPK kináza kináza YODA, MAPK kináza MKK4/5/7/9 a MAP kinázy MPK3/6 jsou nezbytné pro normální rozmístění průduchů. Substrátem pro MAP kinázu jsou bHLH transkripční faktory (např. SPCH, který disponuje cílovou doménou s 10 předpokládanými místy pro fosforylaci, po které dojde k deaktivaci proteinu). MAP kinázová dráha negativně reguluje i pozdější fáze vývoje průduchu (Vatén, Bergmann, 2012).



Obrázek 1: Shrnutí interakcí mezi EPF ligandy a jejich receptory. Zdroj: (Katsir, *et al.*, 2011)

Transkripční faktory

Klíčovou roli během diferenciacce průduchu hrají basic helix-loop-helix (bHLH) transkripční faktory, které disponují basic doménou, která se může vázat k DNA a HLH doménou pro homo- nebo heterodimerizaci a doplňující části, které zprostředkují interakce s jinými proteiny (Ohashi-Ito, Bergmann, 2006). V souvislosti s vývojem průduchů odlišujeme dvě skupiny. První skupina je kódována paralogy *SPEECHLESS* (*SPCH*), *MUTE*, a *FAMA*, které se postupně zapojují do regulace diferenciacce (Peterson, Rychel, Torii, 2010).

Expresce genu *SPCH* probíhá v mladých protodermálních, často dvou sousedících buňkách a je velmi dynamická (Vatén, Bergmann, 2012). Inicjuje první (vstupní) asymetrické dělení (Peterson, Rychel, Torii, 2010). Po tomto dělení ze SLGC zmizí, zatímco v meristemoidu, který se dál asymetricky dělí, zůstává (Vatén, Bergmann, 2012). Overexpresce *SPCH* se projevuje zvýšenou indukcí asymetrických dělení a produkcí nadbytečných průduchů. Mutantní rostlina *spch1* průduchy na listech netvoří, předpokládá se tedy, že *SPCH* je striktně vyžadován pro vstup protodermální buňky do asymetrického dělení a tedy do průduchové linie (MacAlister, Ohashi-Ito, Bergmann, 2007). Mutace v paralogu *SPCH2* (*spch2*) sice tvorbě průduchů nezabraňuje zcela, ale snižuje průduchový index (počet průduchů / počet všech buněk epidermis). Všechny průduchy vytvořené na *spch2* sestávají z morfologicky normálních svěřacích buněk, úloha *SPCH* je tedy pouze ve fázi asymetrického dělení a je specifická pouze pro průduchovou linii (MacAlister, Ohashi-Ito, Bergmann, 2007).

Druhý bHLH protein *MUTE* spouští přeměnu meristemoidu na mateřskou buňku svěřacích buněk. Jeho expresce probíhá ve všech orgánech produkujících průduchy. U mutantních rostlin *mute* byly pozorovány abortované meristemoidy obklopené nadměrným množstvím SLGC jak u embryonálních orgánů (dělohy, hypokotyl), tak u post-embryonálních orgánů (listy, lodyhy, stopky, květní orgány). Na orgánech, které běžně nemají průduchy, nebyl pozorován žádný rozdíl mezi *mute* a divokým ekotypem, tudíž *MUTE* pravděpodobně hraje zásadní roli během vývoje průduchové linie (meristemoid → GMC) bez ohledu na druh orgánu. Při jeho overexpresi nedochází k iniciaci žádných dalších průduchových linií, řídí pouze diferenciaci buněk, které již zahájily svou přeměnu v průduch (Pillitteri, Bogenschutz, Torii, 2008).

Třetím transkripčním faktorem je *FAMA*. Jeho exprese probíhá v mateřských buňkách svěřacích buněk (GMC) a v nedospělých svěřacích buňkách (Vatén, Bergmann, 2012). Funguje jako „přepínač“ mezi dělením a diferenciací, tj. řídí ukončení dělení a zahajuje diferenciaci svěřacích buněk. Mutantní rostlina *fama-1* postrádá průduchy a na jejich obvyklém místě se nacházejí klastry malých, úzkých epidermálních buněk (tzv. *fama* nádory) (Ohashi-Ito, Bergmann, 2006).

Druhá skupina transkripčních faktorů obsahuje *ICE1/SCREAM (SCRM)* a *SCRM2* a jejich proteiny tvoří heterodimery s proteiny transkripčních faktorů první skupiny (Shimada, *et al.*, 2011) a spouštějí tak všechny tři přechody mezi jednotlivými stadii vývoje průduchu (Vatén, Bergmann, 2012). Fenotyp mutanta v obou těchto genech odpovídá fenotypu *spch*, tedy epidermis bez průduchů (Kanaoka, *et al.*, 2008). Bylo zjištěno, že *ICE1/SCREAM* je zapojen i v odpovědi rostliny na stres chladem (Viswanathan, *et al.*, 2003). Je možné, že právě tento gen je uzlovým bodem několika signálních drah zapojených do vývoje průduchů (Vatén, Bergmann, 2012).

Subtilisinu podobná proteáza

Dalším známým negativním regulátorem vývoje průduchů, který modifikuje výsledný počet průduchů na listu, je subtilisin-like proteáza STOMATAL DENSITY AND DISTRIBUTION 1 (SDD1). Jedná se o serinovou proteázu, která je exprimovaná v meristemoidech a mateřských buňkách svěřacích buněk. Mutanty *sdd1* vykazují zvýšenou hustotu průduchů na listu a vznik průduchových klastrů (Von Groll, Berger, Altmann, 2002), většinou dvojic průduchů. SDD1 se přisuzuje proteolytická aktivita k negativním signálním faktorům, např. EPF1 a EPF2. Je také možné, že SDD1 moduluje signální receptory TMM a ERF, nebo že negativně ovlivňuje vývoj průduchů degradací pozitivního regulátoru STOMAGENU (Shimada, *et al.*, 2011). Funkce SDD1 není dosud známá, ale předpokládá se, že se jedná o negativní faktor vývoje průduchů, neboť mutantní rostlina *sdd1* v porovnání s divokým ekotypem tvoří na listech 2-4x více průduchů a průduchové klastry (Schlüter, *et al.* 2003).

Další faktory ovlivňující vývoj průduchů

Asymetrické dělení meristemoidu probíhá vždy tak, aby nový meristemoid byl na odvrácené straně od sousedního průduchu. Za polaritu tohoto dělení odpovídá protein BASL. Před rozdělením buňky je tento protein lokalizován v jádře a v místě jejího dělení podél buněčné stěny. Po rozdělení se lokalizace změní, podle toho, jak se buňka dále vyvíjí (diferenciace svěřacích buněk – v jádře, diferenciace dlaždicové buňky – podél b. stěny, další asymetrické dělení – v jádře i podél b. stěny) (Dong, MacAlister, Bergmann, 2009).

Podobným proteinem se zdá být POLAR. Sdílí některé vlastnosti, např. lokalizaci v buňkách. V dceřiných buňkách působí odlišně – z větší po rozdělení zmizí a v menší, v meristemoidu je transkribován. Jeho lokalizace je závislá na BASL, z toho se usuzuje, že spolupůsobí ve stejné signální dráze (Pillitteri, *et. al.*, 2011).

Přenos signálu

Při vývoji průduchů hrají velkou roli vnější signály z prostředí (např. koncentrace CO₂, ozáření, vlhkost...). Bylo zjištěno, že průběh vývoje průduchů na mladých listech je řízen signály z již dospělých listů (Lake, *et al.*, 2001; Lake, Woodward, Quick, 2002; Coupe, *et. al.*, 2006).

Pravděpodobnou drahou přenosu signálu je Mitogenně aktivovaná proteinová kinázová kaskáda (MAPK kaskáda). MAPK kaskády jsou tří-kinázové signální moduly, které hrají důležitou roli v regulaci reakce na stres a během růstu a vývoje rostlin (Wang, *et al.*, 2007). MAPK kináza kináza YODA, MAPK kináza MKK4/5/7/9 a MAP kinázy MPK3/6 jsou nezbytné pro normální rozmístění průduchů. Substrátem pro MAP kinázu je SPCH, který disponuje cílovou doménou s 10 předpokládanými místy pro fosforylaci, po které dojde k deaktivaci proteinu. MAP kinázová dráha negativně reguluje i v pozdějších fázích vývoje průduchu, avšak její cílové proteiny zatím nejsou známy (Vatén, Bergmann, 2012).

3.2 Faktory vnějšího prostředí a jejich vliv na vývoj průduchů

Podmínky prostředí, ve kterých rostlina musí přežít, nejsou konstantní, proto musí být schopna se jejich změnám neustále přizpůsobovat. Krátkodobě lze změnu podmínek vyřešit otevřením či zavřením průduchů, dlouhodobě se rostlina přizpůsobuje změnou jejich hustoty a velikosti na nově se vyvíjejících listech. Je dokázáno, že hustota průduchů (počet průduchů na jednotku plochy) a průduchový index (poměr počtu průduchů a počtu všech buněk, tedy průduchů i epidermálních buněk) na vyvíjejícím se listu je řízen signály z již dospělých listů. (Miyazawa, Livingston, *et al.*, 2006).

Na zvýšení koncentrace CO₂ v atmosféře, které probíhá od dob průmyslové revoluce, zareagovalo množství nejrůznějších druhů rostlin snížením hustoty průduchů na listech (Casson, Hetherington, 2010).

Dalším environmentálním faktorem, který ovlivňuje vývoj průduchů na listech rostlin, je fotosynteticky aktivní záření (PAR). Hustota průduchů na listech se zvyšuje při vyšší ozáření rostliny (Casson, *et al.*, 2009).

V neposlední řadě ovlivňují množství průduchů na listech i vlhkostní podmínky (stres suchem, nízká relativní vlhkost vzduchu) (Hamanishi, *et al.*, 2012; Tricker, *et al.*, 2012).

Poole, *et al.*, (2000) si také povšimli korelace mezi hustotou průduchů a průduchovým indexem u rostlin ze změněných i ambientních podmínek a zároveň negativní korelace mezi hustotou epidermálních buněk a průduchovým indexem pouze u rostlin v atmosféře s vyšší koncentrací CO₂. Pozitivní korelace byla průkazná i mezi hustotou průduchů a hustotou epidermálních buněk. Tyto výsledky poukazují na to, že jedním z faktorů ovlivňujících variabilitu průduchového indexu je míra expanze epidermálních buněk.

3.2.1 Koncentrace CO₂ v atmosféře

Změny v koncentraci CO₂ mají vliv na množství průduchů, které se formují na nových listech (Woodward, 1987). Se zvyšující se koncentrací CO₂ v atmosféře se u většiny druhů hustota průduchů a průduchový index snižuje, a to jak v geologickém čase (dlouhodobě), tak v laboratorních podmínkách (krátkodobě).

Při zdvojnásobení koncentrace CO₂ se hustota průduchů na listu snížila v průměru o 29%, tato hodnota je však vysoce druhově specifická. Hodnota byla vypočítána na základě pozorování 110 druhů rostlin. Bylo také zjištěno, že větší rozdíl v hustotě průduchů v ambientních a změněných podmínkách vykazují amfistomatické druhy rostlin oproti hypostomatickým. Vliv na intenzitu reakce má také základní hustota průduchů. Intenzivněji reagují rostliny, které mají při běžné koncentraci CO₂ větší hustotu průduchů na listu (Woodward, Kelly, 1995). Efekt zvýšené koncentrace CO₂ dále ovlivňuje relativní vlhkost (Lake, Woodward, 2008).

Výzkumy prováděné na rostlinách s panašovanými listy ukázaly, že při zvýšené koncentraci CO₂ se zvyšuje množství průduchů jak na pokožce zelených tak i bílých částí listů. To dokazuje, že regulace počtu průduchů nesouvisí bezprostředně s intenzitou fotosyntézy (Beerling, Woodward, 1995).

Jako gen, který hraje určitou roli v regulaci množství průduchů formujících se na listu, byl u *Arabidopsis* identifikován *HIGH CARBON DIOXIDE (HIC)*. Tento gen ovlivňuje počet průduchů formujících se na listu, ale neovlivňuje vzor jejich rozmístování, tzn. že u mutantů tohoto genu nedochází k poruchám rozmístování stomat např. tvorbě klastrů (Gray, *et al.*, 2000). Jeho exprese probíhá ve svěracích buňkách. Gen vykazuje určitou homologii ke genu pro β keto-acyl co-A syntázu, která je součástí systému produkujícího dlouhořetězcové mastné kyseliny tvořící voskovou kutikulu (Casson, Hetherington, 2010). Při snížení jeho exprese a při zvýšené koncentraci CO₂ v atmosféře rostliny reagují zvýšením průduchové hustoty i průduchového indexu. U kontrolního (divokého) ekotypu dochází při zvýšení koncentrace CO₂ v atmosféře ke snížení průduchové hustoty i průduchového indexu (Coupe, *et al.*, 2006).

Mechanismus jeho funkce není zatím znám. Podle jednoho z modelů, HIC inhibuje počet satelitních průduchů, které se tvoří kolem jednoho meristemoidu. Tak by exprese *HIC* genu ve svěrací buňce znamenala produkci specifického VLCFA-

derivát inhibitoru, který ostatní typy epidermálních buněk nevytváří a který by interagoval s okolními epidermálními buňkami jako součást kutikulárních vosků. Alternativou by mohl být difusibilní inhibitor, produkovaný svěřací buňkou a šířící se kutikulou, inhibující vznik průduchů z některé z okolních buněk (Bird, Gray, 2003).

3.2.2 Fotosynteticky aktivní záření (kvantita a kvalita)

Rostliny vyvinuly několik systémů fotoreceptorů, kterými monitorují kvalitu, množství i směr dopadajícího fotosynteticky aktivního záření (PAR). U huseničku (*Arabidopsis thaliana*) se jedná o kryptochrom 1 a 2, fototropiny a fytochromy (Kang, *et al.*, 2009). Zvýšená ozáření pozitivně ovlivňuje počet průduchů u rostlin a to jak jejich hustotu, tak průduchový index (Schoch, *et al.*, 1980) přitom ale není porušeno pravidlo jedné vmezežené buňky. Míra ozáření tedy ovlivňuje „rozhodnutí“ protodermální buňky, zda se z ní stane průduch či dlaždicová buňka (Casson, Gray, 2008).

Při pokusech, které provedli Casson, *et al.*, 2009 bylo zjištěno, že zvýšení hustoty průduchů na listech způsobuje červené spektrum světla. Při vyšších ozářeních v jiných spektrech světla nebylo zvýšení průduchové hustoty pozorováno. Z toho vyplývá, že hlavní roli ve zprostředkování změn ve vývoji průduchů jako reakci na PAR, hrají fytochromy, konkrétně fytochrom B. Ten se po fotoaktivaci přesune z cytoplazmy do jádra, kde interaguje s tzv. PIF faktory (phytochrome-interacting factors), což je několik blízce příbuzných bHLH transkripčních faktorů. Z pokusů s rostlinami kurantními v genech pro jednotlivé faktory dále Casson, *et al.*, 2009 zjistili, že se konkrétně jedná o *PIF4*. Zajímavostí je, že *PIF4* zprostředkuje také odpověď - rostliny na zvýšenou teplotu prostředí (Casson, Hetherington, 2010). Podle Kumara, *et al.*, (2012) se *PIF4* faktor také podílí na teplotně závislé aktivaci kvetení skrze FT protein (florigen).

Kang, *et al.*, (2009) dále zjistil, že vývoj průduchů je ovlivněn i modrým spektrem světla - prostřednictvím kryptochromu a také ubiquitin ligasou COP1. Vypadá to, že vliv PAR na vývoj průduchů spočívá právě ve spolupráci signálního systému kryptochrom-fytochrom-COP1 a MAP kinázové signální dráhy.

3.2.3 Vlhkostní podmínky

Zatímco u tohoto faktoru prostředí je velmi dobře znám jeho účinek na otevřenost průduchového póru, jen velmi málo se doposud ví o jeho schopnosti regulovat počet průduchů, tvořících se na listech. Je možné, že ABA jako rostlinný hormon regulující otevírání a zavírání průduchů, může také ovlivňovat vývoj průduchů v návaznosti na vlhkostní poměry prostředí (Casson, Hetherington, 2010), resp. na intenzitu transpirace. Lake a Woodward, (2008) zjistili, že hustota průduchů roste s intenzitou transpirace bez ohledu na to, zda byla ovlivněna vlhkostí, koncentrací CO₂, nebo vnější aplikací ABA.

3.3 Kyselina abscisová

ABA je terpenoid, který je syntetizován z karotenoidů. Při stresu suchem může její koncentrace v rostlině stoupnout až třicetnásobně. Její biosyntézu a akumulaci kromě sucha spouští i ostatní druhy stresu, jako salinita nebo nízká teplota. Kromě úlohy klíčového stresového hormonu zastává ještě funkci ve vývojových procesech rostliny, jako je např. buněčné dělení, dozrávání semen, dormance semen, klíčení a růst klíčnicích rostlin (Procházka, *et al.*, 1998).

Vodní deficit spouští biosyntézu ABA, její akumulaci a distribuci xylémem do celé rostliny (Wilkinson, Davies, 2002). ABA sníží ztráty vody tím, že zavře průduchy a zamezí jejich znovuotevření. Modulace průduchové štěrby je spojená se souborem buněčných biochemických procesů – aktivací G-proteinů (Coursoul, *et al.*, 2003), produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) (Pei, *et al.*, 2000), syntézou oxidu dusnatého (Bright, *et al.*, 2006), zvyšováním cytosolického pH (Irving, *et al.*, 1992), zvyšováním obsahu Ca²⁺, a to jak vtokem přes plasmatickou membránu, tak uvolňováním z cytosolických rezerv (Pei, *et al.*, 2000), proteinovou fosforylací i defosforylací a přeskupením cytoskeletu (Hwang, Lee, 2001). Výsledkem těchto událostí je otevření iontových kanálů a odtok K⁺, Cl⁻ a malátových iontů ze svěřacích buněk, a tím uzavření průduchu a zamezení jeho znovuotevření (Li, *et al.*, 2006). Zavírání průduchů nebude zřejmě jediným mechanismem, který ABA spouští, ovlivňuje zřejmě i hydraulickou vodivost (Pantin, *et al.*, 2013) a nějakou roli patrně hraje i v následné lepší odolnosti k dalšímu působení stresu (aklimace).

3.4 Stabilní izotopy uhlíku v rostlinách – využití ve fyziologii rostlin

Izotopová frakcionace – diskriminace ^{13}C

Uhlík se v přírodě vyskytuje ve dvou stabilních izotopech (nuklidech), ^{12}C (98,982 %) - lehký a ^{13}C (1,018%) – těžký. Mají stejný počet protonů a elektronů a liší se počtem neutronů. Na rozdíl od radioizotopů (^{14}C) se nerozpadají a neemitují záření. Izotopový poměr je poměr těžšího (^{13}C) izotopu uhlíku k lehčímu (^{12}C) ve vzorku podle vztahu $R_{\text{sample}} = \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}$

Pojmem frakcionace (δ) rozumíme izotopový poměr vzorku vztažený k podílu obou izotopů u standardu, vyjádřený v promilích:

$$\delta(\text{‰}) = \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}} - 1} * 1000$$

Mezinárodně uznávaným standardem je v případě uhlíku PeeDee Belemnite (PDB).

δC_3 rostlin je v závislosti na podmínkách prostředí obvykle -20 až -30‰, δC v případě CO_2 atmosféry je přibližně -8‰.

Ve fyziologii rostlin nás spíše zajímá srovnání izotopového poměru vzorku rostlinného materiálu se substrátem, tedy CO_2 v atmosféře. K tomu používáme veličinu diskriminace Δ , vyjádřenou v kladných hodnotách promile:

$$\Delta(\text{‰}) = \frac{(\delta_{\text{substrát}} - \delta_{\text{produkt}})}{1 + \frac{\delta_{\text{produkt}}}{1000}}$$

Pro C_3 rostliny platí pro diskriminaci vztah, odvozený Farquharem, *et al.*, (1982):

$$\Delta = a + (b - a) * \frac{C_i}{C_a}$$

kde a = diskriminace $^{13}\text{CO}_2$ při průchodu přes průduchy difusí (4,4‰), b = diskriminace při karboxylaci enzymem Rubisco (27‰), C_i = koncentrace CO_2 v podprůduchové dutině, C_a = koncentrace CO_2 v atmosféře. Těžší molekula se pohybuje pomaleji, a proto jí přes průduchy do rostliny difunduje o 4,4‰ méně. Navíc Rubisco má vyšší afinitu k CO_2 s lehčím atomem uhlíku, což způsobuje, že do organických sloučenin, cukrů, je přednostně zabudováván lehčí izotop uhlíku (27‰),

cca 2‰ je frakcionace při přechodu do vodní fáze (rozpuštění $^{13}\text{CO}_2$) a difuze ve vodné fázi buněk. Výsledná diskriminace ^{13}C rostlinou je tedy 29‰ (Farguhar, *et al.*, 1989).

Z tohoto vztahu lze vypočítat vnitřní koncentraci CO_2 (C_i), kterou nelze jednoduše změřit.

3.5 Infračervená termografie – využití ve fyziologii rostlin

Vibračními pohyby nabitých částic, ze kterých jsou složeny objekty a přesuny mezi energetickými hladinami vzniká infračervené záření. Toto záření je závislé na teplotě tělesa, šíří se i vakuem a může být vyzařováno na všech vlnových délkách elektromagnetického spektra. Oblast vlnové délky větší než viditelné záření a menší než mikrovlnné záření je infračervenou oblastí. Pokud je teplota tělesa menší než 525°C , veškerá vyzářená energie je v infračervené oblasti a tudíž pro oko člověka neviditelná (ČVUT Praha, 2011).

Optika používaná v termografii je téměř shodná s optikou fotoaparátů, kamer atd., liší se však použitým materiálem (objektiv kamery je z germania) a spektrem vlnových délek, které propouští. Infračervená kamera měří (detekuje pomocí mikrobolometru) a zobrazuje objektem vyzařované infračervené záření, které přímo závisí na povrchové teplotě objektu (Flir, Uživatelská příručka).

Pokud jsou průduchy na listech otevřeny, dochází k transpiraci, tj. k odpařování vody, přitom se spotřebovává energie, čímž se list ochlazuje. Pokud jsou průduchy uzavřeny, teplota listu se zvyšuje. Pokud tedy srovnáváme dvě rostliny, z nichž jedna má otevřenější průduchy než druhá, můžeme mezi nimi nalézt teplotní rozdíl (Jones, *et al.*, 2002).

4. Materiál a metody

Pokusnou rostlinou byl zvolen huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* L.), ekotyp *Columbia*. Jedná se o významnou modelovou rostlinu, která je v molekulárně-biologických studiích využívána pro svou nenáročnost, krátkou generační dobu a relativně malý plně sekvenovaný jaderný genom.

V rámci mojí diplomové práce byly prováděny dva pokusy. První pokus probíhal na podzim 2011 a zahrnoval pouze dvě varianty rostlin: rostliny kontrolní a rostliny, kterým byla do živného roztoku přidána kyselina abscisová (ABA) v koncentraci 10^{-5} M. Obě tyto varianty byly pěstovány při stejné ozářenosti ($150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Druhý pokus probíhal na jaře 2012 a byl rozšířen o dvě úrovně světelných podmínek. Kontrolní rostliny tak byly pěstovány při nižší ($150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) a vyšší ($250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) ozářenosti a stejně tak rostliny s ABA aplikovanou ke kořenům.

4.1 Podmínky pěstování rostlin

Semena rostlin byla nakličována na vlhké vatě (3 dny v chladu, 4 dny při pokojové teplotě) a po vyklíčení byla přesazena do hydroponie. Rostliny byly pěstovány hydroponicky v grodanových kostkách, které byly upevněny ve víku nádoby naplněné Hoaglandovým roztokem (¼ koncentrace solí - složení viz příloha). Obsah nádoby s objemem 7 litrů byl provzdušňován vzduchovacím kamínkem napojeným na motorek, běžně používaný v akvaristice. Kvůli eliminaci růstu řas v živném roztoku byl povrch víka pokryt aluminiovou folií. Nádoby s rostlinami byly umístěny v klimaboxu (Snijders scientific, NL). Vlhkost vzduchu se pohybovala kolem 50-70%. Světelná perioda byla 10/14 hodin (délka dne/noci) při teplotách – den/noc $20^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$. Po 5-ti týdnech růstu byla polovině rostlin do živného roztoku přidána kyselina abscisová (ABA) – finální koncentrace ABA v živném roztoku byla 10^{-5} M. Po dvou týdnech od první aplikace ABA do živného roztoku byl roztok obnoven včetně ABA.

4.2 Analýza exprese genů

Odběr vzorků

Pro analýzu exprese *STOMAGENu* byly pinzetou odebírány nejmladší listy v různé rostliny 0., 1., 3., 7. a 14. den od přidání ABA k roztoku (u prvního pokusu) a 3., 5. a 7. den po přidání ABA (u druhého pokusu), v každém termínu odběru byly současně odebrány paralelní vzorky z kontrolních rostlin. Rostlinný materiál byl vložen do kryozkumavky a ihned zmražen ponořením do kapalného dusíku. Do analýzy byly vzorky uloženy v mrazicím boxu při -80°C.

Izolace RNA

Izolace totalRNA byla provedena pomocí kitu Nucleo Spin RNA Plant (Macherey-Nagel, DE) ze 100 mg materiálu (listů) podle instrukcí výrobce. Koncentrace total RNA byla stanovena měřením absorbance při 260 nm na spektrofotometru BioPhotometer Plus (Eppendorf, DE) a pro syntézu cDNA byly vzorky podle potřeby naředěny RNase-free vodou. Čistota byla odhadnuta podle poměru absorbance při 260/280nm. Kvalita izolované RNA byla dále ověřena elektroforeticky na agarozovém gelu (denaturační elektroforéza na 1,2% agarozovém gelu, FA (formaldehydový pufr), 10xFA (200 mM MOPS, 50 mM octan sodný, 10 mM EDTA, pH 7,0), 1xFA (100 ml 10x FA, 20 ml 37% (12,3 M) formaldehyd, 880 ml RNase-free voda).

Syntéza cDNA

Z 1 µg total RNA byla provedena syntéza cDNA pomocí kitu High capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystems, USA) opět podle instrukcí výrobce.

Real Time PCR

Real Time RT-PCR analýza exprese byla provedena na přístroji Step One Real-time PCR system (Applied Biosystems-Life Technologies, USA). Reakce proběhla ve 40 cyklech s použitím TaqMan Gene expression Master Mix a TaqMan gene expression assay kitů pro *STOMAGEN* (AT4g 12970) – assay identifier

At02219575_gl (Applied Biosystems, USA). Jako referenční (house keeping) gen byl použit *ACTIN8* (At1g49240), TaqMan gene expression assay kit At02270958-gH. Relativní exprese genu byla vypočtena podle metody $\Delta\Delta C_T$ (threshold cycle) podle Livak, Schmittgen, (2001). Jako kalibrátor byl použit vzorek kontrolních rostlin bez přidané ABA z odběru 3. den po aplikaci v 1. pokuse a vzorek kontrolních listů bez přidané ABA pěstovaných na vyšší intenzitě světla z 3. dne po aplikaci ABA ve 2. pokuse. Pro zpřesnění výpočtu relativní exprese byla z kalibrační křivky pro každý gen (assay) spočtena efektivita reakce.

Ověření správnosti průběhu Real-time RT_PCR reakce a velikosti produktu deklarované výrobcem assaye bylo provedeno elektroforeticky na agarózovém gelu (2% agaróza, TAE pufr, napětí 120 mV, post-staining barvení pomocí Gel-Red barviva, UV detekce).

4.3 Stanovení počtu průduchů a průduchového indexu.

Odběry listů pro analýzu počtu průduchů byly prováděny 2 týdny po přidání ABA. Dospělé listy z růžice byly ustřiženy, přestřiženy na poloviny a nalepeny na oboustranou lepicí pásku (polovina listu byla adaxiální stranou nahoru, polovina abaxiální stranou nahoru). Vzorky k počítání průduchů a epidermálních buněk byly připraveny klasickou metodou otisků listů do bezbarvého laku na nehty. Listy byly ihned natřeny bezbarvým lakem na nehty (Rimmel – Lycra Pro, UK) a označeny pořadovým číslem. Vrstva laku musí být tenká a musí se natřít co nejrychleji po utržení listu, než buňky ztratí turgor. Po zaschnutí byl lak s otiskem listu přenesen pomocí průhledné lepicí pásky na podložní sklíčko. Při pozorování v mikroskopu jsou vidět povrchové nerovnosti listu otištěné do laku – tedy obrysy epidermálních buněk, průduchů, popř. trichomů apod.

Z každého listu (2-3 listy z každé rostliny, 3 rostliny pro každou variantu, při jednotlivých odběrech) bylo pod mikroskopem (Olympus BX61, Japan) vyfoceno 5 polí o velikosti cca 0,13 mm² při zvětšení 500x. V těchto polích byly počítány průduchy a epidermální buňky pomocí softwaru Image J, jejich počty byly následně

přepočítávají na 1 mm² a byl stanoven průduchový index SI (stomatal index) ze vztahu:

$$SI = SD / (SD + ED)$$

kde SD = počet průduchů na 1 mm² a ED počet epidermálních buněk 1 mm².

4.4 Analýza stabilních izotopů uhlíku, vnitřní koncentrace CO₂

Byly odebírány dospělé, mladé i starší (stále fotosyntetizující, ne odumírající) listy a byly vloženy do označené mikrozkušavky (z každé rostliny podle velikosti 2-4 listy) a byly usušeny do konstantní hmotnosti (sušení 4,5 hodiny, 70 °C).

Poté byly do každé mikrozkušavky přidány 2 nerezové kuličky. Takto připravené mikrozkušavky se vzorky a kuličkami byly vloženy do kulového mlýnku (Retsch, MM 200, DE) a homogenizovány (při frekvenci třepání 30 ot.s⁻¹ po dobu 20 s). Do cínových kapslí 8x5 mm (SerCon, UK) byla zabalena navážka v rozmezí 0,35 – 0,45 mg vzorku (na vahách Mettler Toledo MT 5, d = 1 µg).

Vlastní analýza byla prováděna na izotopovém poměrovém hmotnostním spektrometru Delta^{XL} plus (Finnigan, DE) spojeném s jednotkou ConFloIII (Finnigan, DE) zajišťující kontinuální tok nosného plynu (helium) čistoty 4.6. V prvkovém analyzátoru Vario MicroCube (Elementar Analysen systeme, DE) byly vzorky spalovány na CO₂ při teplotě 950°C. Jako pracovní standard byla při analýze použita celulóza (IAEA-C3) (International Atomic Energy Agency, A), která byla měřena vždy před a po sérii deseti vzorků. Obsah izotopů uhlíku byl vyjádřen pomocí jejich poměru ve vzorku $R_{\text{vzorek}} = {}^{13}\text{C}:{}^{12}\text{C}$ a následně jako hodnota izotopové frakcionace $\delta^{13}\text{C}$ vztažené k mezinárodnímu standardu VPDB (Vienna PeeDee Belemnite) $\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{vzorek}}}{R_{\text{standart}}} - 1 \right) * 1000$ [‰].

Hodnota ¹³C diskriminace byla spočtena podle vztahu

$$\Delta(O/OO) = \frac{(\delta_{\text{substrát}} - \delta_{\text{produkt}})}{1 + \frac{\delta_{\text{produkt}}}{1000}}$$

kde δ_{produkt} je hodnota izotopové frakcionace listů a $\delta_{\text{substrát}}$ průměrná hodnota frakcionace ve vzorcích vzduchu z klimaboxu (-10,6 ‰), změřená pomocí IRMS.

Ze zjištěných hodnot $\delta^{13}\text{C}$ byla vypočítána koncentrace CO_2 v podprůduchové dutině (C_i) podle vztahu (Farquhar, *et al.*, 1980)

$$\Delta = a + (b - a) * \frac{C_i}{C_a}$$

4.5 IR termografie

Pomocí IR kamery ThermaCam P660 (FLIR, Sweden) byla sledována teplota listů všech variant v průběhu jednotlivých pokusů. IR snímky byly uloženy na paměťovou kartu. Pro stanovení průměrné teploty listů každé varianty bylo na každém snímku vybráno 10 polí na náhodně vybraných rostlinách a listech a pomocí softwaru ThermaCam Reporter 8.2 (FLIR Sweden) byla stanovena jejich teplota, v programu Microsoft Excel (Microsoft, USA) byla pak vypočítána průměrná teplota pro jednotlivé varianty.

4.6 Statistická analýza a grafické zpracování dat

Výsledná data byla statisticky zpracována (t-test, ANOVA) v programu STATISTICA 6 (StatSoft, USA) a grafické zpracování obrázků v Microsoft Excel 2007 (Microsoft, USA).

5. Výsledky

Pro zjednodušení orientace ve vzorcích a interpretace výsledků jsem zvolila následující pojmenování skupin rostlin:

1. pokus: a) K – kontrolní rostliny, pěstované bez přidání ABA (ozáření $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
b) ABA – rostliny s přidanou ABA do roztoku (ozáření $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
2. pokus: a) K HL – kontrolní rostliny, pěstované bez přidání ABA do živného roztoku při ozáření $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
b) K LL – kontrolní rostliny, pěstované bez přidání ABA do živného roztoku při ozáření $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
c) ABA HL – rostliny s přidanou ABA do roztoku, pěstované při ozáření $250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
d) ABA LL – rostliny s přidanou ABA do roztoku, pěstované při ozáření $150 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

5.1 Termografie

Po přidání ABA (kyseliny abscisové) ke kořenům rostlin bylo možné pomocí termografie pozorovat rozdíl v teplotě listů mezi ABAou ošetřenými a kontrolními rostlinami. Výsledek analýzy teplot listů rostlin z prvního pokusu byl podobný výsledku pokusu druhého, který je důkladně popsán níže. Fotografie odpovídají stavu rostlin po 3 hodinách od přidání ABA.

Tabulka 1: Průměrná teplota listu u kontrolních rostlin a rostlin s ABA aplikovanou ke kořenům při různé ozáření

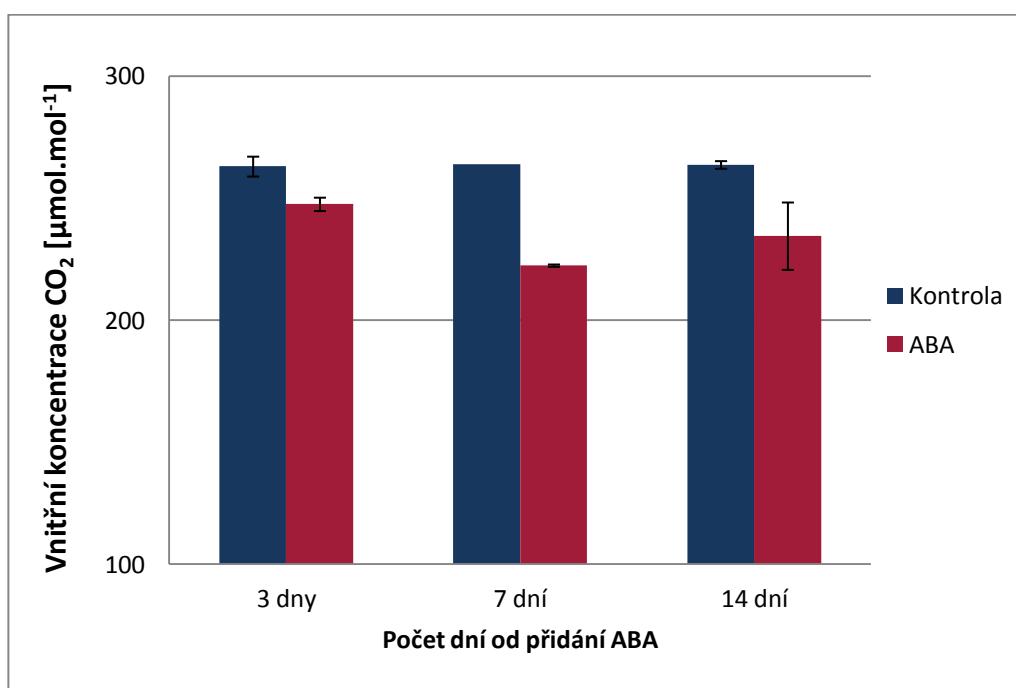
Varianta	Průměrná teplota listu (3 hodiny po přidání ABA) [°C]	Průměrná teplota listu (3 hodiny po výměně roztoku bez i s ABA) [°C]
K HL	19,79	19,61
K LL	19,54	20,24
ABA HL	21,72	21,11
ABA LL	21,82	21,33

Průměrný rozdíl teplot mezi rostlinami s ABA aplikovanou ke kořenům a rostlinami kontrolními byl 2,1°C. Listy kontrolních rostlin byly „chladnější“ než u rostlin s ABA. Z toho se dá vyvodit, že k roztoku přidaná kyselina abscisová způsobila uzavření průduchů a rostliny tím částečně ztratily schopnost ochlazování a zároveň došlo ke snížení přísunu CO₂ do listu. Tento efekt byl pozorován i při obnovení roztoku včetně opětovného přidání ABA dva týdny po prvním přidání, avšak rozdíl v teplotách byl 1,3 °C, tedy o 0,8°C nižší.

Mezi teplotami listů rostlin pěstovaných při rozdílné ozáření nebyl pozorován statisticky významný rozdíl.

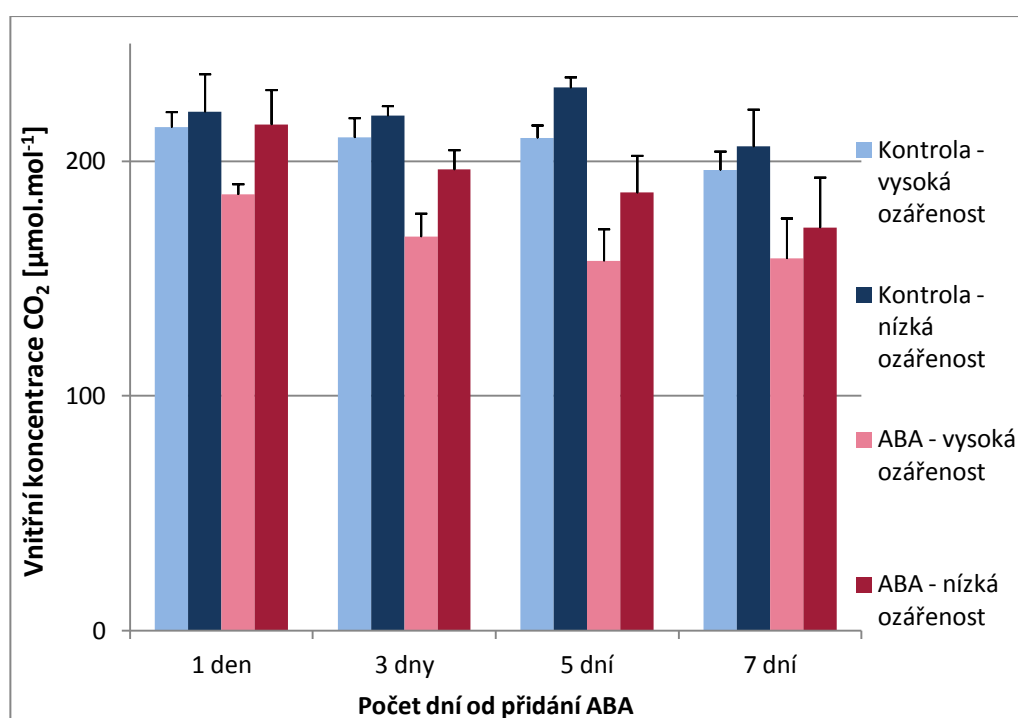
5.2 Vnitřní koncentrace CO₂

Spočtená koncentrace CO₂ v podprůduchové dutině (uvnitř listu) rostlin z prvního i druhého pokusu se pohybovala v rozmezí od 141 do 264 μmol.mol⁻¹.



Obrázek 2: Vnitřní koncentrace CO₂ – 1. pokus. Koncentrace CO₂ v podprůduchové dutině listu u rostlin kontrolních i s ABA přidanou do roztoku 3, 7 a 14 dní po zásahu. Sloupce vyjadřují průměrné hodnoty ze 3 nezávislých opakování (rostlin), úsečky představují směrodatné odchylky výběrového souboru.

V prvním pokusu byla koncentrace CO₂ v podprůduchové dutině rostlin, kterým byla do roztoku přidána ABA, prokazatelně nižší než u rostlin kontrolních 3 dny ($t=4,45440$; $df=4$; $p=0,011209$) a 7 dní po přidání ABA ($t=35,81684$; $df=4$; $p=0,000004$). Větší rozdíl mezi těmito dvěma skupinami byl zjištěn 7. den po přidání ABA do roztoku (rozdíl $41,5 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$). Rozdíl mezi rostlinami s ABA v roztoku a kontrolou 14 dní po zásahu nebyl statisticky průkazný. Koncentrace CO₂ v podprůduchové dutině kontrolních rostlin byla po celou dobu téměř konstantní ($263,5 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1} \pm 0,5$).



Obrázek 3: Vnitřní koncentrace CO₂ – 2. pokus. Koncentrace CO₂ v podprůduchové dutině listu u rostlin kontrolních i s ABA přidanou do roztoku, pěstovaných při vyšší ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a nižší ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření, 1., 3., 5. a 7. den po zásahu. Sloupce vyjadřují průměrné hodnoty ze 3 nezávislých opakování (rostlin), úsečky představují směrodatné odchylky výběrového souboru.

V druhém pokusu opět nebyl u kontrolních rostlin pozorován výrazný rozdíl v koncentraci CO₂ v podprůduchové dutině mezi jednotlivými dny odběru vzorku. Ani mezi kontrolními rostlinami, které rostly při odlišné ozáření, nebyl rozdíl (kromě vzorků odebraných 5 dní po aplikaci ABA) statisticky významný.

Již 1 den po přidání ABA do roztoku byl pozorován rozdíl ve vnitřní koncentraci CO₂ mezi těmito a kontrolními rostlinami pěstovanými při vyšší ozáření ($t=5,421335$; $df=4$; $p=0,0056$). Mezi rostlinami s ABA v roztoku a kontrolními

pěstovanými při nižší ozáření nebyl 1 den po přidání ABA zatím pozorován statisticky významný rozdíl.

Po 3 dnech od aplikace ABA, byla vnitřní koncentrace CO₂ prokazatelně nižší u rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při vyšší ozáření, než u rostlin s ABA v roztoku při nižší ozáření ($t=-3,21009$; $df=4$; $p=0,032$). Rostliny s ABA v roztoku měly po 3 dnech od aplikace ABA statisticky prokazatelně nižší vnitřní koncentraci CO₂ než kontrola, jak při nízké ozáření ($t=3,607949$; $df=4$; $p=0,0226$) tak při vysoké ozáření ($t=4,750129$; $df=4$; $p=0,0089$). Rozdíl mezi kontrolními rostlinami pěstovanými při vysoké a nízké ozáření nebyl statisticky významný.

U vzorků odebraných 5 dní od aplikace ABA byla vnitřní koncentrace CO₂ nižší u rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při vyšší ozáření, než u kontrol pěstovaných při vyšší ozáření ($t=5,204002$; $df=4$; $p=0,0064$), u rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při nižší ozáření, než u kontrol pěstovaných při nižší ozáření ($t=3,945552$; $df=4$; $p=0,017$), i u kontrol pěstovaných při vyšší ozáření, než u kontrol pěstovaných při nižší ozáření ($t=0,010616$; $df=4$; $p=0,0106$).

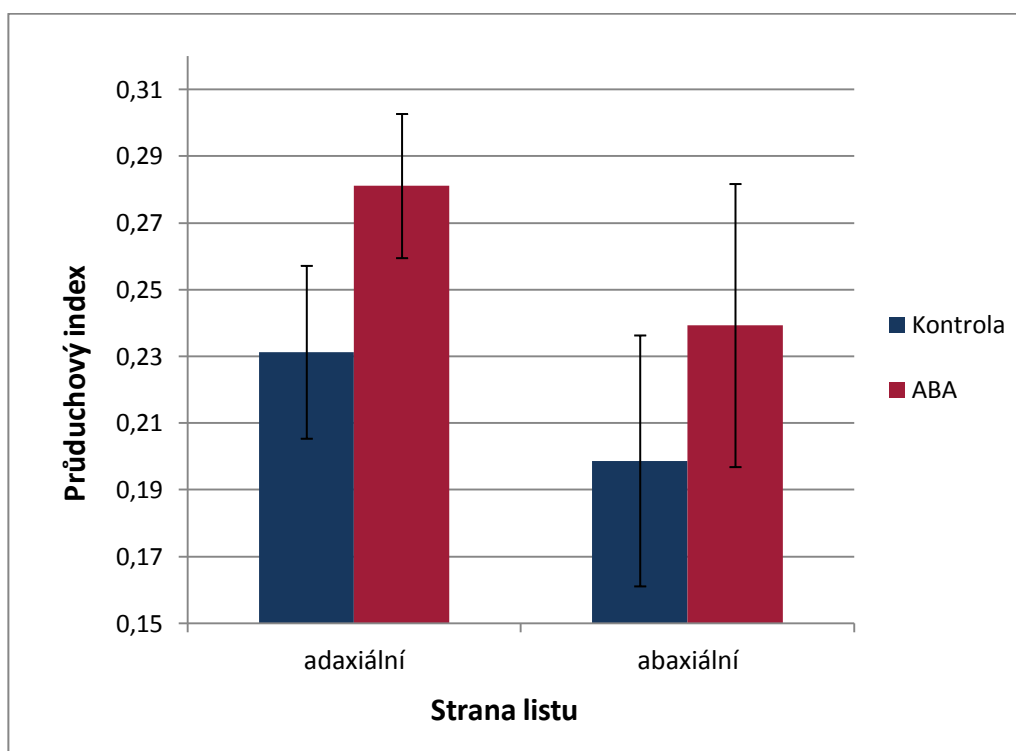
U vzorků odebraných 7 dní po aplikaci ABA nebyl pozorován průkazný rozdíl mezi jednotlivými skupinami, z důvodu vyšší variability při měření.

5.3 Počet průduchů na listech

Pro vyjádření počtu průduchů na listech rostlin jsem zvolila průduchový index (SI): $SI = SD / (SD + ED)$ $SD = \text{ hustota průduchů na } mm^2$

$ED = \text{ hustota epidermálních buněk na } mm^2$

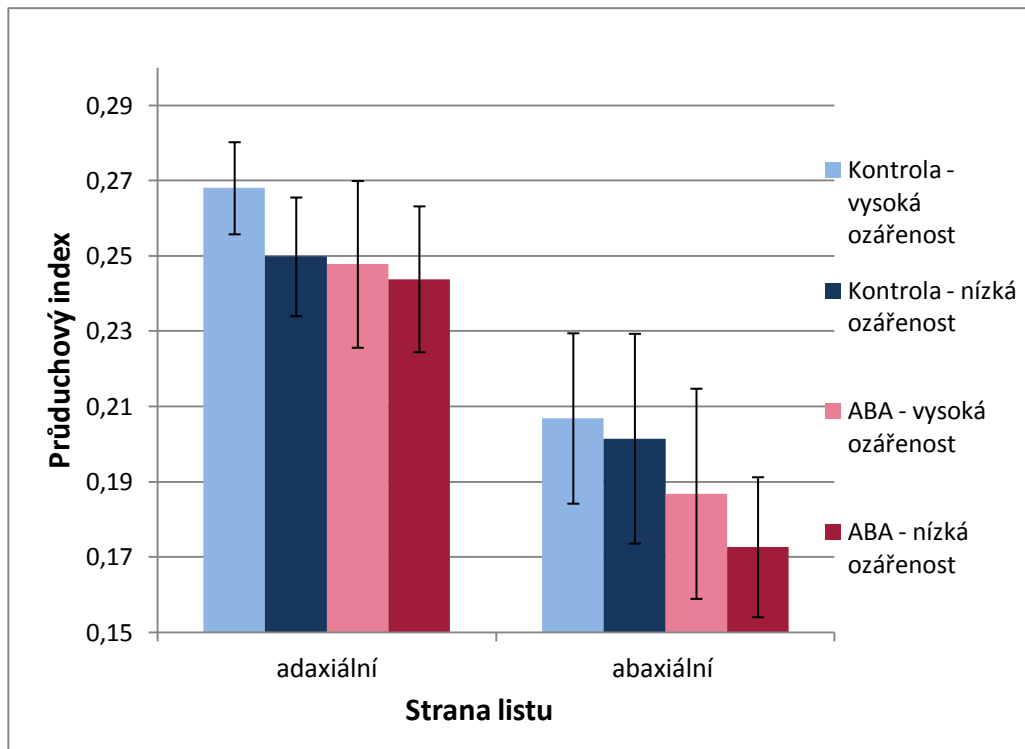
Výsledky prvního a druhého pokusu se v případě průduchového indexu značně lišily. Průduchový index listů rostlin pěstovaných při prvním pokusu byl obecně vyšší než u pokusu druhého.



Obrázek 4: Průduchový index – 1. pokus. Průduchový index listů rostlin kontrolních a s ABA přidanou do živného roztoku pro adaxiální i abaxiální stranu listu. Sloupce vyjadřují průměrné hodnoty z 9-10 listů, úsečky představují směrodatné odchylky výběrového souboru.

Během prvního pokusu byly pro otisky listů odebírány dospělé listy v růžici 14 dní po přidání ABA do roztoku. Tyto listy již byly plně vyvinuté a na jejich povrchu nebyly pozorovány žádné meristemoidy.

Na adaxiální straně listů byl statisticky prokazatelně vyšší průduchový index u rostlin, které měly do roztoku přidanou ABA než u rostlin kontrolních ($t=3,367787$; $df=18$; $p=0,0034$) a stejně tak na abaxiální straně listů ($t=2,327614$; $df=16$; $p=0,0333$).



Obrázek 5: Průduchový index – 2. pokus. Průduchový index listů rostlin kontrolních a s ABA přidanou do živného roztoku, pěstovaných při vyšší ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a nižší ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření, pro adaxiální i abaxiální stranu listu. Sloupce vyjadřují průměrné hodnoty z 9-10 listů, úsečky představují směrodatné odchylky výběrového souboru.

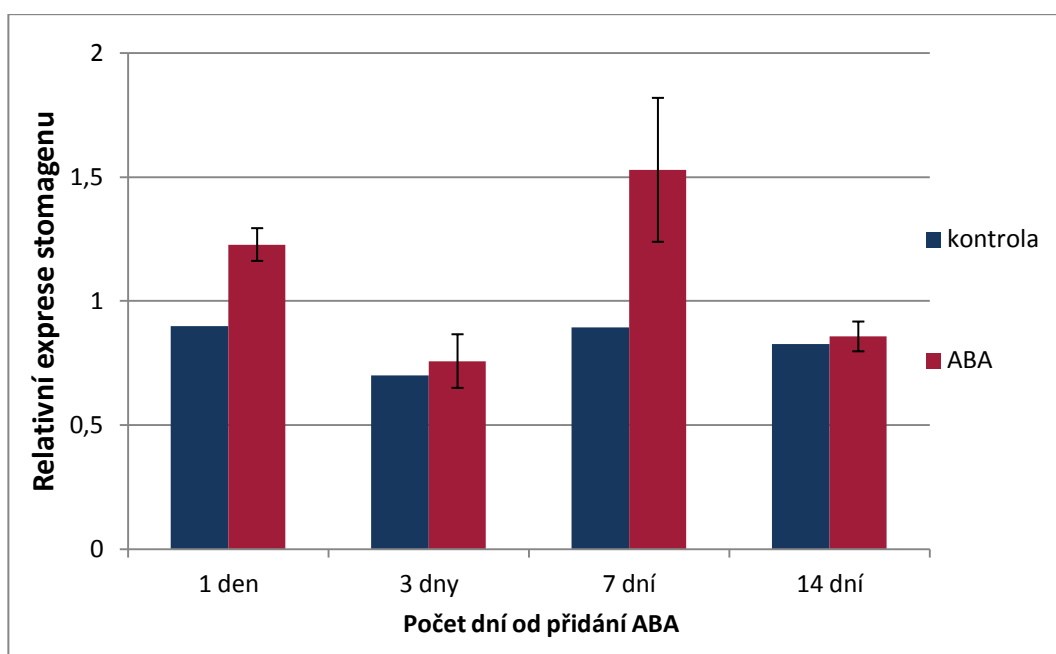
Během druhého pokusu byly otisky sejmuty z listů, které byly při odběru vzorků na analýzu exprese označeny a ponechány v růžici, aby dorostly.

Průduchový index adaxiální strany listů kontrolních rostlin pěstovaných při vyšší ozáření byl vyšší než u listů kontrolních rostlin pěstovaných při nižší ozáření ($t=3,042272$; $df=64$; $p=0,00343$) a než u listů rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při vyšší ozáření ($t=-5,129$; $df=56$; $p=0,000004$). Průduchový index adaxiální strany listů kontrolních rostlin pěstovaných při nižší ozáření byl vyšší než průduchový index rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při nižší ozáření ($t=-2,57503$; $df=81$; $p=0,0118$). Rozdíl mezi průduchovým indexem adaxiální strany listů rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při vyšší a nižší ozáření nebyl statisticky významný.

Průduchový index abaxiální strany listů kontrolních rostlin pěstovaných při nižší ozáření byl vyšší než průduchový index listů rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při nižší ozáření ($t=0,172$; $df=82$; $p=0,00002$). Průduchový index abaxiální strany listů kontrolních rostlin pěstovaných při vyšší ozáření byl vyšší než průduchový index rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při vyšší ozáření ($t=-3,7993$; $df=101$;

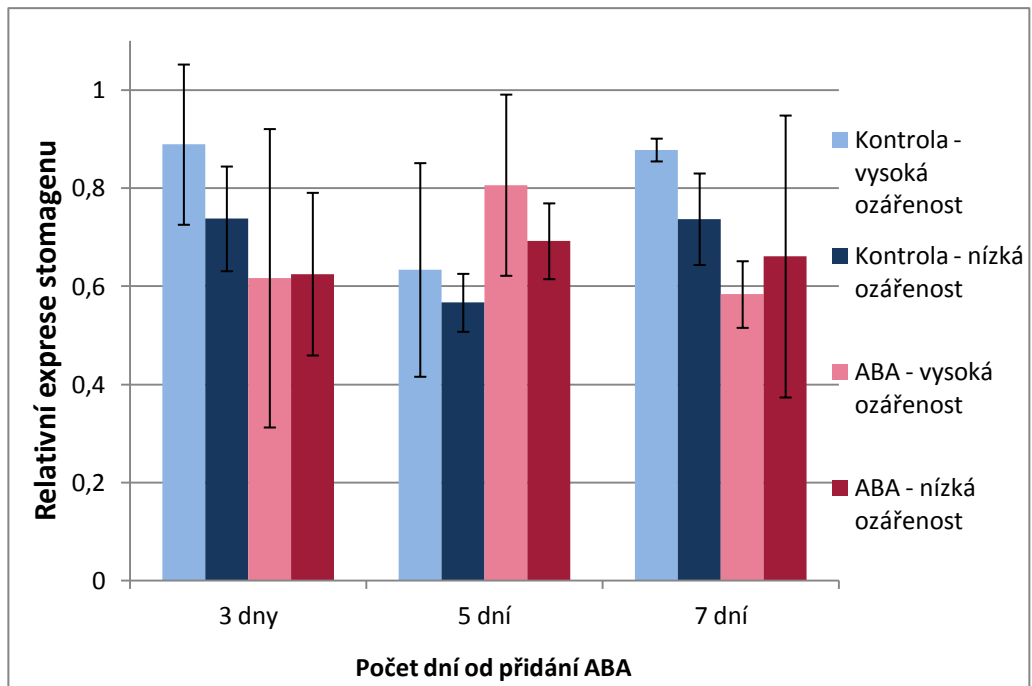
$p=0,0002$). Průduchový index abaxiální strany listů rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při vyšší ozáření byl vyšší než průduchový index listů rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při nižší ozáření ($t=2,32017$; $df=99$; $p=0,0224$). Rozdíl v průduchovém indexu abaxiální strany listů kontrolních rostlin pěstovaných při vyšší a nižší ozáření nebyl statisticky významný.

5.4 Relativní exprese stomagenu



Obrázek 6: Relativní exprese *STOMAGENU* – 1. pokus. Relativní exprese *STOMAGENU* v rostlinách kontrolních i s ABA přidanou do roztoku, 1., 3., 7. a 14. den po zásahu. Referenční gen – *ACTIN8*. Sloupce vyjadřují průměrné hodnoty ze 3 rostlin, úsečky představují směrodatné odchylky výběrového souboru.

V prvním pokusu byla u rostlin s ABA v roztoku statisticky průkazně vyšší relativní exprese stomagenu ve vyvíjejících se listech než u rostlin kontrolních 1. ($t=-2,5271$; $df=8$; $p=0,0354$) a 7. den ($t=-2,47833$; $df=8$; $p=0,038211$) po přidání ABA k roztoku. 3 a 14 dnů po zásahu nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl mezi těmito dvěma skupinami rostlin.

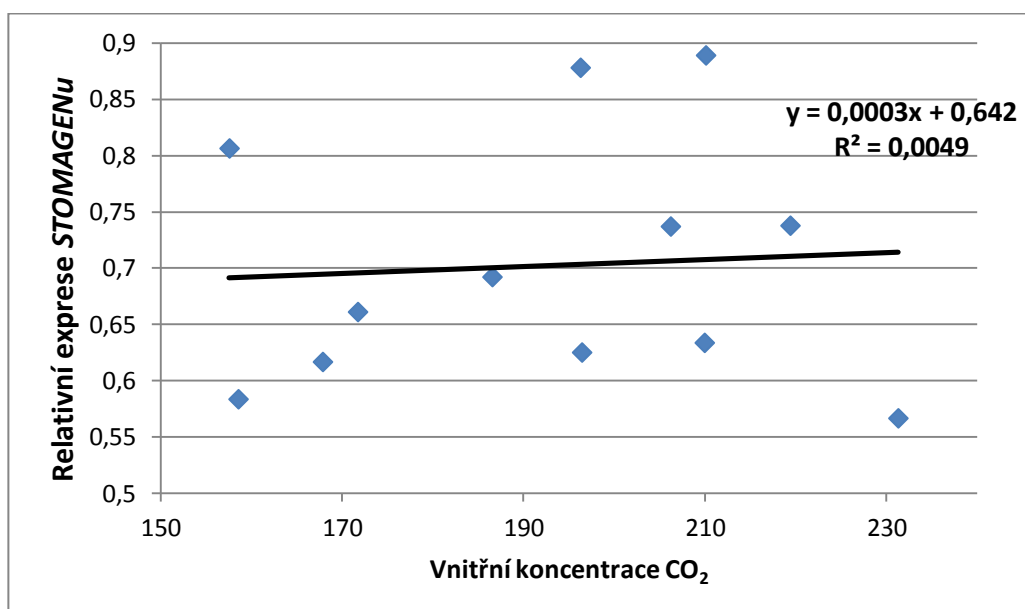


Obrázek 7: Relativní exprese STOMAGENU – 2. pokus. Relativní exprese *STOMAGENU* v rostlinách kontrolních i s ABA přidanou do roztoku, pěstovaných při vyšší ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a nižší ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ozáření 3, 5 a 7 dnů po zásahu. Referenční gen – *ACTIN8*. Sloupce vyjadřují průměrné hodnoty ze 3-6 rostlin, úsečky představují směrodatné odchylky výběrového souboru.

V druhém pokusu byla v relativní expresi stomagenu pozorována značná variabilita. U rostlin odebraných 3 dny po zásahu s ABA v roztoku pěstovaných při vysoké ozáření byla statisticky prokazatelně nižší relativní exprese stomagenu než u kontrol pěstovaných na vysokém světle. Kontrolní rostliny pěstované při vysoké ozáření 3 dny po zásahu vykazovaly vyšší relativní expresi stomagenu než kontrolní rostliny pěstované při nižší ozáření. 7 dnů po zásahu byla relativní exprese stomagenu vyšší už rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při vyšší ozáření, než u rostlin kontrolních pěstovaných při vyšší ozáření.

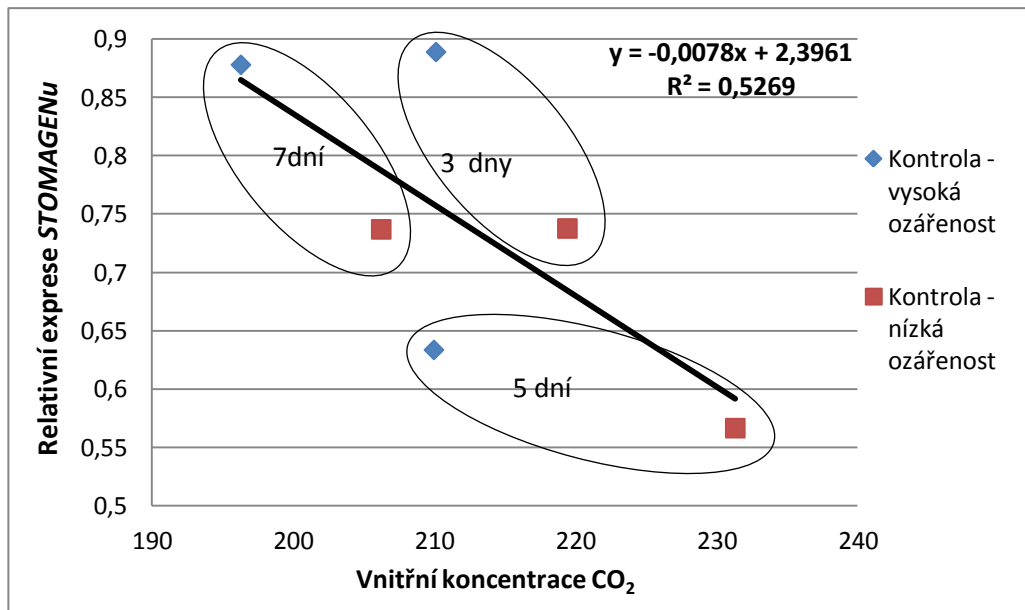
Podle grafického znázornění lze u kontrolních rostlin pozorovat vyšší expresi při vyšší ozáření, kvůli vysoké variabilitě vzorků to však není statisticky průkazné.

5.5 Korelace mezi vnitřní koncentrací CO₂ a relativní expresí *STOMAGENU*



Obrázek 8: Korelace mezi vnitřní koncentrací CO₂ a relativní expresí *STOMAGENU* – 2. pokus. Korelace mezi C_i a relativní expresí *STOMAGENU* kontrolních rostlin i s ABA v roztoku pěstovaných při vyšší (250 μmol m⁻² s⁻¹) a nižší (150 μmol m⁻² s⁻¹) ozáření. Referenční gen – *ACTIN8*, hodnoty odpovídají průměrným hodnotám jednotlivých kategorií rostlin.

Mezi vnitřní koncentrací CO₂ a relativní expresí *STOMAGENU* v listech všech kategorií rostlin prvního (data nezobrazena) i druhého pokusu nebyla pozorována statisticky průkazná závislost.



Obrázek 9: Korelace mezi vnitřní koncentrací CO₂ a relativní expesí *STOMAGENU* listů kontrol – 2. pokus. Korelace mezi C_i a relativní expesí *STOMAGENU* kontrolních rostlin při vyšší (250 μmol m⁻² s⁻¹) a nižší (150 μmol m⁻² s⁻¹) ozáření. Referenční gen – *ACTIN8*, hodnoty odpovídají průměrným hodnotám jednotlivých kategorií rostlin.

Mezi vnitřní koncentrací CO₂ a relativní expesí *STOMAGENU* v listech kontrolních rostlin pěstovaných při vyšší i nižší ozáření nebyla pozorována statisticky významná závislost.

6. Diskuze

Již delší dobu je známo, že hustota průduchů (SD) a průduchový index (SI) se obecně snižují při snížení intenzity ozáření (Schoch, *et al.*, 1980) a při zvýšení koncentrace CO₂ v atmosféře (Woodward, Kelly, 1995). Lake, *et al.*, (2001) ukázali, že snížení hustoty průduchů se projevuje i na mladých vyvíjejících se listech, pokud jsou zastíněné jen ty dospělé. To naznačuje, že přenos signálu spuštěného změnou ozáření směřuje z těchto dospělých listů do mladších, ještě se vyvíjejících. Coupe, *et al.*, (2006) poukázal na to, že také změna v koncentraci CO₂ v kvetovém systému, která zahrnovala pouze dospělé listy, způsobovala změnu v hustotě průduchů i na vyvíjejících se listech, které byly vystaveny ambientní atmosféře.

Vzhledem k tomu, že se jedná právě o intenzitu světla a koncentraci CO₂, na první pohled by se mohlo zdát, že signálem směřujícím ze starších do mladších listů bude některý z produktů fotosyntézy. Zastínění a zvýšení koncentrace CO₂ v atmosféře je ale v tomto směru diametrálně odlišným zásahem. Podle měření koncentrace cukrů a intenzity fotosyntézy, které provedl Coupe, *et al.*, (2006) to vypadá, že přímá spojitost mezi fotosyntézou a regulací hustoty průduchů na listech není. Toto tvrzení podporují i výsledky pokusů pánů Beerlinga a Woodwarda, (1995) prováděných na listech rostlin s panašovanými listy, kde nebyl prokázán rozdíl mezi hustotou průduchů na bílých a zelených částech listů.

Vyvstává tedy otázka, co je tím signálem, na který list reaguje změnou hustoty průduchů. Jak již bylo zmíněno, zvýšená ozáření nebo snížená koncentrace CO₂ jsou signálem pro zvýšení hustoty průduchů na nově se vyvíjejících listech. Oba tyto faktory způsobují snížení koncentrace CO₂ uvnitř listu. Nabízí se proto možnost, že vnitřní koncentrace CO₂ je vlastním faktorem, který spouští nebo zastavuje expresi genů (v případě jeho snížení spouští expresi *STOMAGENU*, jako pozitivního regulátoru) řídících vývoj průduchů na listu. *STOMAGEN* je jediný dosud známý pozitivní regulátor vývoje průduchů, člen rodiny EPF faktorů (Hunt, Gray, 2009; Sugano, *et al.*, 2010, Kondo, *et al.*, 2010). Jeho exprese probíhá v mezofylu, fotosyntetickém pletivu, což by také mohlo podporovat teorii vnitřní koncentrace CO₂ jako vlastního faktoru. Cílem pokusů prováděných v rámci této diplomové práce bylo tuto možnost ověřit. Snahou bylo snížit vnitřní koncentraci CO₂ modelových rostlin a sledovat míru exprese *STOMAGENU*. Očekávala jsem navýšení exprese tohoto genu a počtu průduchů na listech těchto rostlin.

Snížení vnitřní koncentrace CO₂ bylo provedeno dvěma způsoby – přidáním kyseliny abscisové do živného roztoku (1. i 2. pokus) a zvýšením ozáření rostlin (jen 2. pokus). Efekt kyseliny abscisové (ABA) projevující se přivřením průduchů bylo možné pozorovat pomocí IR termografie. Ta je využívána jako proxy pro průduchovou vodivost či rychlost transpirace (Jones, *et al.*, 1999, Jones, *et al.*, 2002; Lake, Woodward, 2008). Listy kontrolních rostlin byly v průměru o 2,1 °C chladnější (kvůli vyšší transpiraci), než listy rostlin s ABA v roztoku. Předpokládám, že listy těchto rostlin se více zahřívaly, protože kyselina abscisová přidaná do živného roztoku byla transportována do listů a způsobila přivření průduchů. Došlo ke snížení výparu z listu, k omezení jeho ochlazování a současně ke snížení C_i, díky snížení příjmu CO₂ skrze přivřené průduchy.

Druhým způsobem snížení vnitřní koncentrace CO₂ bylo zvýšení intenzity ozáření rostlin (původní - 150 μmol.m⁻².s⁻¹ a zvýšená - 250 μmol.m⁻².s⁻¹). Mezi rostlinami kontrolními, pěstovanými při různé ozáření nebyl pozorován statisticky významný rozdíl v teplotě listů, stejně tak jako u rostlin s ABA v roztoku pěstovaných při různé ozáření. Dá se tedy vyloučit vliv teploty při vyšší ozáření na zkreslení výsledků.

Důkazem pro tvrzení, že byla snížena vnitřní koncentrace CO₂ je její výpočet z výše uvedeného vztahu pro izotopovou diskriminaci Δ¹³C v organické hmotě listů podle Farquhara, *et al.*, (1989), neboť experimentální měření není možné. Již první den po přidání ABA do roztoku byla naměřena vyšší (méně záporná) hodnota izotopové frakcionace ¹³C u rostlin pěstovaných při vyšší ozáření. Tedy i vnitřní koncentrace CO₂ odvozená z δ¹³C byla nižší. To odpovídá faktu, že diskriminace těžšího izotopu uhlíku je u slunných listů obecně menší, než u listů stinných, protože intenzita fotosyntézy u slunných listů stoupá a snižuje tak poměr C_i/C_a (poměr koncentrace CO₂ v podprůduchové dutině ke koncentraci CO₂ v okolní atmosféře) (Duursma, Marshall, 2006). Vzhledem k rychlosti fotosyntézy u těchto rostlin je navíc změna v δ¹³C jako reakce na uzavření průduchů rychlejší, než u rostlin pěstovaných při nižší ozáření. Po 3, 5 i 7 dnech po přidání ABA do roztoku byla vnitřní koncentrace CO₂ v rostlinách nižší u rostlin s ABA v roztoku v porovnání s kontrolními – bez ABA, bez ohledu na míru ozáření. O vývinu průduchů na novém listu rozhodují vnější podmínky listu staršího, již dospělého (Miyazawa, *et al.*, 2006). Proto mnou zvolený metodický postup zahrnoval analýzu izotopové

diskriminace ^{13}C v dospělých listech (zdroj signálu) a zároveň expresi *STOMAGENU* v mladých vyvíjejících se listech (příjem signálu).

V prvním pokusu byla vnitřní koncentrace CO_2 snižována pouze přidáním kyseliny abscisové do živného roztoku. Hustota průduchů (vyjádřená pomocí průduchového indexu SI) na listech těchto rostlin byla statisticky prokazatelně vyšší než u rostlin kontrolních, což odpovídá mému původnímu předpokladu i tvrzení Lakea a Woodwarda (2008), kteří se domnívají, že hustota průduchů na listu je řízena intenzitou transpirace a koncentrací ABA v listu. Byly počítány počty průduchů a SI na plně vyvinutých listech 2 týdny po přidání kyseliny abscisové do živného roztoku. Vybírala jsem dospělé, vyvinuté listy, u nichž jsem neznala jejich přesné stáří. Podle Schocha, *et al.* (1980) mohou mít vliv na vývoj průduchů podmínky prostředí již šest dní před objevením se listu. Listy, které jsem v prvním pokusu odbírala, se tak mohly v růžici začít tvořit dlouho před přidáním kyseliny abscisové a výsledný obraz jejich povrchu mohl být proto zkreslený. Z výsledků pokusů mé bakalářské práce (Jelínková, 2011) však bylo zjevné, že průduchový index na listech rostlin se mění po celou dobu jejich růstu, i když se podmínky prostředí nezmění hned v rané fázi vývoje listu. V druhém pokuse byla upravena metodika odběru otisků listů. Jeden z nejmladších listů ve středu růžice byl při přidávání kyseliny abscisové do živného roztoku označen bílou tečkou, a tento list se následně nechal dorůst a byl použit pro otisk na analýzu hustoty průduchů.

Průduchový index rostlin z druhého pokusu však neodpovídá mému původnímu předpokladu. Rostliny, kterým byla do živného roztoku přidána kyselina abscisová, měly nižší průduchový index, než rostliny kontrolní. Domnívám se, že tento výsledek mohl být ovlivněn tím, že rostliny, které mají v živném roztoku přidanou kyselinu abscisovou, jsou zpomalovány ve svém růstu, a proto jejich listy mohly být v porovnání s listy kontrolních rostlin v době odběru ještě nedostatečně vyvinuté, o čemž koneckonců svědčil vyšší počet meristemoidů, které obvykle nacházíme na listech s nedokončeným vývojem. Navíc sousední listy v růžici přibližně stejného stáří byly odebrány pro analýzu exprese genů. „Osamocený“ list mohl tedy být stresován nejen přítomností kyseliny abscisové, ale i otrháním okolních listů.

V prvním pokuse byla exprese stomagenu 1. a 7. den po aplikaci ABA vyšší a 3 dny po přidání kyseliny abscisové do živného roztoku byla průměrná relativní exprese *STOMAGENU* srovnatelná s kontrolními rostlinami

Výsledky exprese *STOMAGENU* v druhém pokusu jsou díky rozšíření o variantu, kde byla vnitřní koncentrace CO₂ snížena intenzitou světla jasnější. Kontrolní rostliny, které byly pěstovány při vyšší ozáření, vykazovaly vyšší relativní expresi *STOMAGENU* než rostliny pěstované při nižší ozáření. To by odpovídalo předpokladu, neboť tyto rostliny měly nižší vnitřní koncentraci CO₂ (komentováno výše), avšak rostliny s kyselinou abscisovou přidanou do živného roztoku neměly jednotnou reakci v expresi *STOMAGENU* na změnu vnitřní koncentrace CO₂. Vzhledem k reakci rostlin lze očekávat možnou reakci na vnitřní koncentraci CO₂ cca od 3. dne po aplikaci ABA. Zvýšení relativní exprese *STOMAGENU* oproti kontrole bylo zaznamenáno 5. den po aplikaci ABA. Volba kyseliny abscisové jako nástroje pro snížení vnitřní koncentrace CO₂ v listech rostlin možná může být sporná, neboť dosud není znám přesný mechanismus jejího účinku a tudíž výsledky pokusů mohou být ovlivněny jejími dalšími účinky, které neznáme.

Při pokusech s topoly, které byly vystaveny stresu suchem, bylo zjištěno, že listy těchto rostlin mají sníženou expresi *STOMAGENU* (v závislosti na době působení sucha) a hustotu průduchů (Hamanishi, Thomas, Campbell, 2012). ABA je však známá hlavně jako tzv. stresový hormon, jehož biosyntéza a akumulace v rostlině roste při stresu (nejen) suchem (Procházka, *et al.*, 1998). Topoly, které měly sníženou hustotu průduchů na listech, měly současně zvýšenou exogenní koncentraci ABA, což odporuje již zmíněnému tvrzení Lakea a Woodwarda (2008), že hustota průduchů roste s koncentrací ABA v listu.

Mezi vnitřní koncentrací CO₂ a relativní expresí *STOMAGENU* v listech všech rostlin nebyla pozorována lineární závislost. Statisticky neprůkazná negativní lineární závislost byla nalezena mezi vnitřní koncentrací CO₂ a expresí *STOMAGENU* v listech rostlin kontrolních (neovlivněných ABA) pro různé úrovně ozáření. Nabízí se několik možných vysvětlení. *STOMAGEN* jako první známý pozitivní regulátor hustoty průduchů na listech zřejmě nereaguje na změnu vnitřní koncentrace CO₂. Je velmi pravděpodobné, že existují jiné pozitivní regulátory, které zatím neznáme, a je možné, že vnitřní koncentrace CO₂ je signálem pro expresi některého z těchto genů. Variabilita v expresi *STOMAGENU* mezi jednotlivými dny odběrů vzorků by také mohla být způsobena tím, že míra jeho exprese je řízena jakousi zpětnovazebnou smyčkou nebo že jeho úkolem je pouze kompetice o vazebná místa receptorů s negativními regulátory, jejichž exprese je řízena vnějšími faktory. Není známá signální dráha mezi kvantitou světla a množstvím průduchů na

listech rostlin, co se týká kvality světla, je znám efekt červeného spektra světla, které ovlivňuje hustotu průduchů na listu prostřednictvím fytochromu B a transkripčního faktoru PIF4, jak popsal Casson, *et al.*, (2009). Další variantou vysvětlení také může být to, že jsem v rámci svých dvou pokusů pracovala pouze na úrovni genové exprese, to nevyklučuje např. vliv na posttranslační úrovni. Množství proteinu jsem nestanovovala. Efekt ABA na funkci průduchů je zprostředkován přes kinázovou aktivitu MAPK3 (Gudesblat, *et al.*, 2006), možná takto ovlivňuje i vývoj průduchů na nových listech. Brasinosteroidy dále řídí vývoj průduchů přes změny fosforylace MAPKKK, YODA (Kim, *et al.*, 2013).

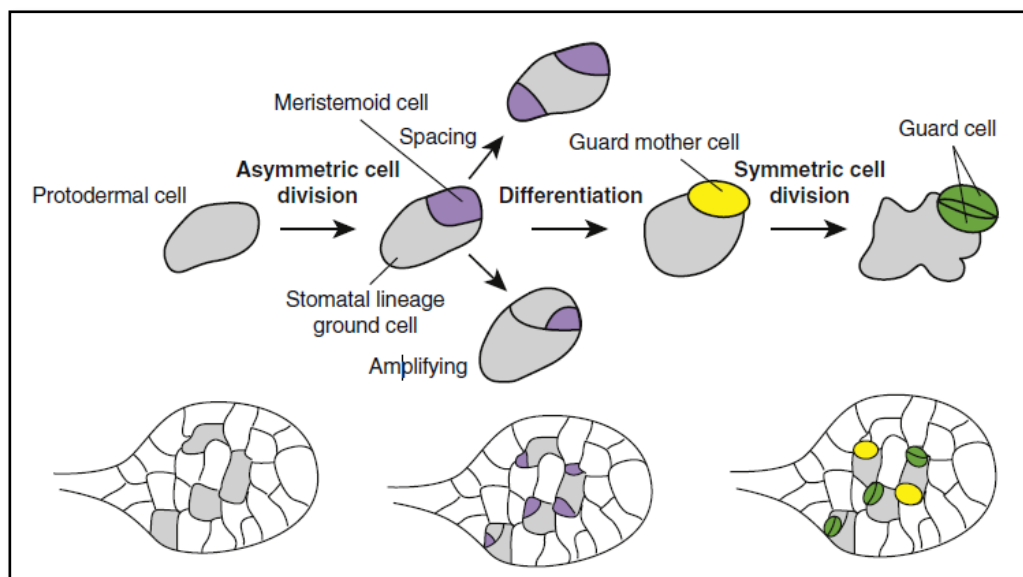
Pro další výzkum bych zařadila i variantu pěstování rostlin v umělé atmosféře se sníženou vnější koncentrací CO₂, kde by se mohlo ukázat zda *STOMAGEN* svou expresí vůbec reaguje na jakoukoliv změnu koncentrace CO₂, ať už vnější nebo vnitřní. Upravila bych také způsob odebrání vzorků pro analýzu exprese a stanovení počtu průduchů. Po otrhání listů v růžici pro analýzu exprese je zbývající „osamocený“ list vystaven stresujícím podmínkám, které mohou ovlivnit jeho následný vývoj. Proto si myslím, že by bylo vhodné odebírat vzorky z růžice buď jen pro analýzu exprese, nebo pro stanovení počtu průduchů. Konečně bych také navrhla navýšení počtu rostlin v jednotlivých kategoriích a celkové zvýšení počtu vzorků a měření.

7. Závěr

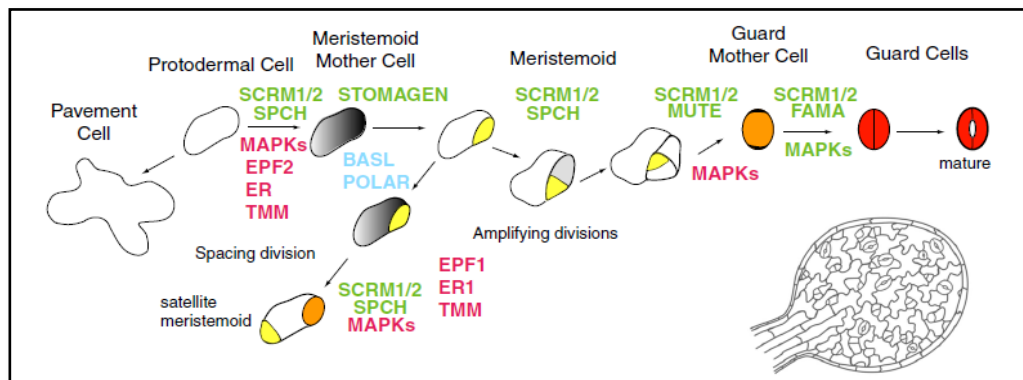
Podle hypotézy, na jejímž základě vznikla má diplomová práce, měla být vnitřní koncentrace CO₂ signálem, který spouští expresi *STOMAGENU* ve vyvíjejících se listech modelové rostliny a tím ovlivňovat hustotu průduchů na listu. Cílem práce bylo tuto hypotézu ověřit. Výsledky mnou provedených pokusů potvrzují, že zvýšená ozáření způsobuje snížení vnitřní koncentrace CO₂ v listech rostlin a zvýšení hustoty průduchů na jejich povrchu. Expres *STOMAGENU* v listech byla vyšší pouze v případě, byla-li vnitřní koncentrace CO₂ snížena prostřednictvím intenzity světla, při které byly rostliny pěstovány. V případě snížení vnitřní koncentrace CO₂ v rostlinách přidáním kyseliny abscisové do živného roztoku nebyl pozorován efekt na expresi *STOMAGENU* ve vyvíjejících se listech těchto rostlin.

Hypotézu, podle které je vnitřní koncentrace CO₂ signálem, který spouští expresi *STOMAGENU* ve vyvíjejících se listech modelové rostliny se nepodařilo potvrdit.

8. Přílohy



Obrázek 10: Schéma vývoje průduchů u *Arabidopsis*. Ilustrace pro jednotlivé buňky i v kontextu vyvíjejícího se listu. Zdroj: (Katsir, *et al.*, 2011)



Obrázek 11: Vývoj průduchů u *Arabidopsis*. Diagram znázorňující hlavní stádia vývoje průduchu a jeho regulátory. Pozitivní regulátory jsou znázorněny zeleně, negativní červeně, polární modře. Žlutě znázorněné buňky = meristemoidy, oranžové = mateřské buňky svěracích buněk, červené = svěrací buňky, šedé = mateřské buňky meristemoidu. V pravém dolním rohu je znázornění mladého listu. Zdroj: Vatén, Bergmann, 2012



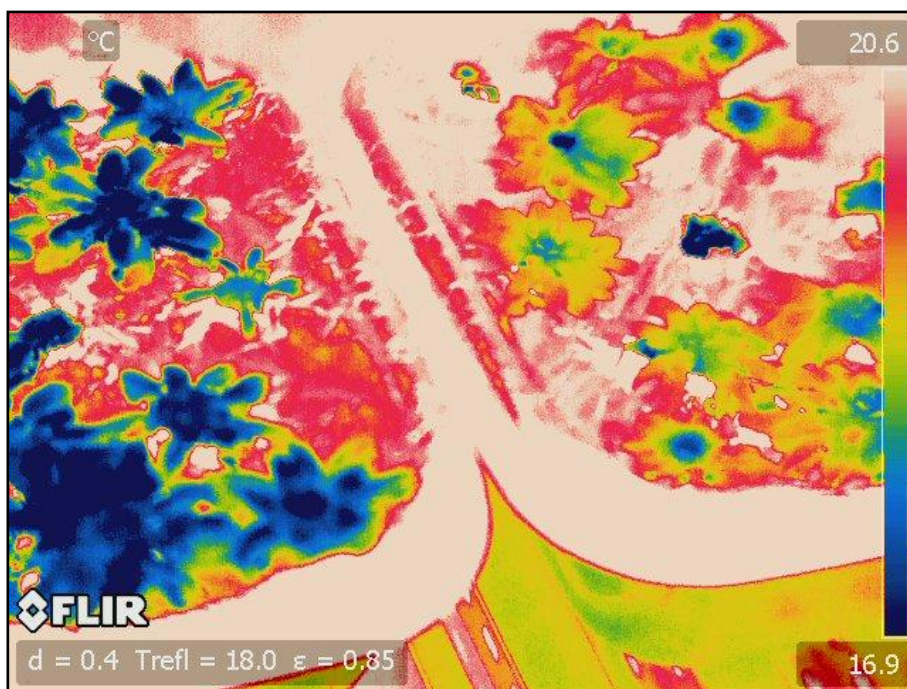
Obrázek 12: Rostliny *Arabidopsis thaliana* pěstované v hydroponii



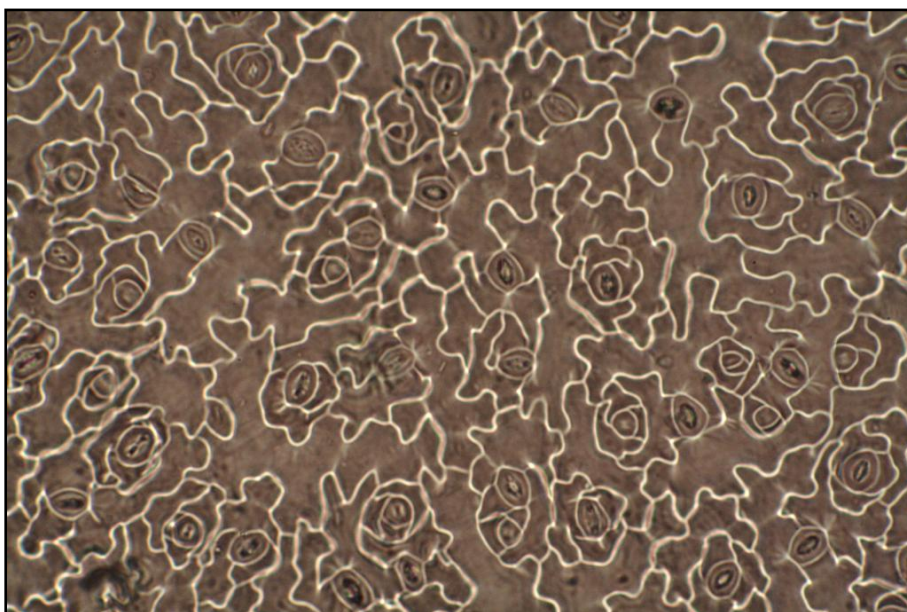
Obrázek 13: Kořeny rostlin pěstovaných v hydroponii

Tabulka 2: Složení Hoaglandova roztoku

<u>Složení plného Hoaglandova roztoku – ředění vodou 1:3</u>	Molekulová hmotnost	Koncentrace zásobných roztoků [mM]	Objem [ml/l]	Výsledná koncentrace [μM]
KNO ₃	101,1	1000	6	6000
Ca(NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	236,16	1000	4	4000
NH ₄ H ₂ PO ₄	115,08	1000	1	1000
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	246,49	1000	2	2000
Navážka zásobní roztok [mg/l]				
Mikroelementy a vitamíny				
KI		7,5		
H ₃ BO ₃		30		
MnSO ₄ . 4H ₂ O		132		
ZnSO ₄ .7H ₂ O		20		
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		2,5		
CuSO ₄ .5H ₂ O		0,25	10	
CoCl ₂ .6H ₂ O		0,25		
Na ₂ EDTA		373		
FeSO ₄ .7H ₂ O		278		
inositol		1000		
kyselina nikotinová		10		
pyridoxin.HCl		10		
thiamin.HCl		100		
Navážka [g/l]				
Citrát železitý		6	1	



Obrázek 14: IR termografický snímek rostlin kontrolních (vlevo) a s ABA v roztoku (vpravo)



Obrázek 15: Otisk listu *Arabidopsis thaliana* v laku na nehty. Zvětšeno 500x.

9. Literatura

ABRASH, E. B., BERGMANN, D. C. Regional specification of stomatal production by the putative ligand CHALLAH. *Development*, 2010, vol. 137, p. 447–455.

ABRASH, E. B., DAVIES, K. A., BERGMANN, D. C. Generation of signaling specificity in Arabidopsis by spatially restricted buffering of ligand–receptor interactions. *The Plant Cell*, 2011, vol. 23, p. 2864–2879.

BEERLING, D. J., WOODWARD, F. I. Leaf stable carbon-isotope composition records increased water-use efficiency of C-3 plants in response to atmospheric CO₂ enrichment. *Functional Ecology*, 1995, vol. 9, no. 3, p. 394–401.

BIRD, S. M., GRAY, J. E. Signals from cuticle affect epidermal cell differentiation. *New Phytologist.*, 2003, vol. 157, p. 9–23.

BRIGHT, J., DESIKAN, R., HANCOCK, J. T., WEIR, I. S., NEILL, S. J. ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant Journal*, 2006, vol. 45, p. 113–122.

BROWNLEE, C. The long and the short of stomatal density signals. *Trends in Plant Science*, 2001, vol. 6, no. 10, p. 441–442.

CASSON, S. A., FRANKLIN, K. A., GRAY, J. E., GRIERSON, C. S., WHITELAM, G. C., HETHERINGTON, A. M. Phytochrome B and PIF4 regulate stomatal development in response to light quantity. *Current Biology*, 2009, vol. 19, p. 229–234.

CASSON, S. A., HETHERINGTON, A. M. Environmental regulation of stomatal development. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, vol. 13, p. 90–95.

CASSON, S., GRAY, J. E. Influence of environmental factors on stomatal development. *New Phytologist*, 2008, vol. 178, p. 9–23.

COUPE, S. A., PALMER, B. G., LAKE, J. A., OVERY, S. A., OXBOROUGH, K., WOODWARD, F. I., GRAY, J. E., QUICK, W. P.

Systemic signalling of environmental cues in Arabidopsis leaves. *Journal of Experimental Botany*, 2006, vol. 57, no. 2, p. 329–341.

COURSOL, S., FAN, L. M., LE STUNFF, H., SPIEGEL, S., GILROY, S., ASSMANN, S. M. Sphingolipid signalling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature*, 2003, vol. 423, p. 651–654.

ČVUT Praha Tepelné záření, 2011. Podpora techniky. <http://www.podpora-techniky.cz/page/tepelne-zareni> (accessed March 11, 2013)..

DESIKAN, R. Sniffing stomata?. *New phytologist*, 2010, vol. 188, p. 910–913.

DONG, J., MACALISTER, C. A., BERGMANN, D. C. BASL controls asymmetric cell division in Arabidopsis. *Cell*, 2009, vol. 137, p. 1320–1330.

DUURSMA, R. A., MARSHALL, J. D. Vertical canopy gradients in $\delta^{13}\text{C}$ correspond with leaf nitrogen content in a mixed-species conifer forest. 2006, vol. 20, p. 496–506.

FARGUHAR, G. D., CAEMMERER, S., BERRY, J. A. A biochemical model of photosynthetic CO_2 assimilation in leaves of C_3 species. *Planta*, 1980, vol. 149, p. 78–90.

FARGUHAR, G. D., EHLERINGER, J. R., HUBICK, K. T. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1989, vol. 40, p. 503–537.

FARQUHAR, G. D., OLEARY, M. H., BERRY, J. A. On the relationship between carbon isotope discrimination and the inter-cellular carbon-dioxide concentration in leaves. *Australian journal of plant physiology*, 1982, vol. 9, no. 2, p. 121–137.

FLIR: *Uživatelská příručka Flir B6XX series, P6XX series, SC6XX series*; 2010.

GODIARD, L., SAUVIAC, L., TORII, K. U., GRENON, O., MANGIN, B., GRIMSLEY, N. H., MARCO, Y. ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant Journal*, 2003, vol. 36, p. 353–365.

GRAY, J. E., HOLROYD, G. H., VAN DER LEE, F. M., BAHRAMI, A. R., SIJMONS, P. C., WOODWARD, F. I., SCHUCH, W., HETERINGTON, A. M. The HIC signalling pathway links CO₂ perception to stomatal development.. *Nature*, 2000, vol. 408, p. 713–716.

GUDESBLAT, G. E., IUSEM, N. D., MORRIS, P. C. Arabidopsis MPK3, a Key Signalling Intermediate in Stomatal Function. *Plant Signaling & Behavior*, 2007, vol. 2, no. 4, p. 271.

HAMANISHI, E. T., THOMAS, B. R., CAMPBELL, M. M. Drought induces alterations in the stomatal development program in *Populus*. *Journal of Experimental Botany*, 2012, vol. 63, no. 13, p. 4959–4971.

HARA, K., KAJITA, R., TORII, K. U., BERGMANN, D. C., KAKIMOTO, T. The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes & Development*, 2007, vol. 21, p. 1720–1725.

HASHIMOTO, M. et al. Arabidopsis HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nature Cell Biology*, 2006, vol. 8, no. 4, p. 391–397.

HUMBLE, G. D., RASCHKE, K. Stomatal opening quantitatively related to potassium transport. Evidence from electron probe analysis. *Plant Physiology*, 1971, vol. 48, p. 294–302.

HUNT, L., GRAY, J. E. The Signaling Peptide EPF2 Controls Asymmetric Cell Divisions during Stomatal Development. *Current Biology*, 2009, vol. 19, no. 10, p. 864–869.

HWANG, J. U., LEE, Y. Abscisic acid-induced actin reorganization in guard cells of dayflower is mediated by cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiology*, 2001, vol. 125, p. 2120–2128.

CHAVES, M. M. et al. How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. *Annals of Botany*, 2002, vol. 89, p. 907–916.

IRVING, H. R. et al. Changes in cytosolic calcium levels and by protein kinase and protein phosphatase activities. *Plant Physiology*, 1992, vol. 89, p. 1790–1794.

ISRAELSSON, M.; SIEGEL, R. S.; YOUNG, J.; HASHIMOTO, M.; IBA, K.; SCHROEDER, J. I. Guard cell ABA and CO₂ signaling network updates and Ca²⁺ sensor priming hypothesis. *Current Opinion in Plant Biology* 2006, 9, 654–663.

JELÍNKOVÁ, I. *Vliv faktorů prostředí na vývoj průduchů: bakalářská práce*. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, 2011.

JONES, H. G. Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *Plant cell and environment*, 1999, vol. 22, no. 9, p. 1043–1055.

JONES, H. G., STOLL, M., SANTOS, T., DE SOUSA, C., CHAVES, M., GRANT, O. Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *Journal of experimental botany*, 2002, vol. 53, no. 378, p. 2249–2260.

KANAOKA, M., PILLITERI, L. J., FUJII, H., YOSHIDA, Y., BOGENSCHUTZ, N., TAKABAYASHI, J., ZHU, J., TORII, K. SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to Arabidopsis stomatal differentiation. *The Plant Cell*, 2008, vol. 20, p. 1775–1785.

KANG, Ch., LIAN, H., WANG, F., HUANG, J., YANG, H. Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2009, vol. 21, p. 2624–2641.

KATSIR, L., DAVIES, K. A., BERGMANN, D. C., LAUX, T. Peptide signaling in plant development. *Current biology*, 2011, vol. 21, p. 356–364.

KIM, T., MICHNIEWICZ, M., BERGMANN, D. C., WANG, Z. Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature*, 2012, vol. 482, p. 419–422.

KONDO, T., et al. Stomatal density is controlled by a mesophyll-derived signaling molecule. *Plant Cell Physiology*, 2010, vol. 51, no. 1, p. 1–8.

KUMAR, S. V., LUCYSHYN, D., JAEGER, K. E., ALO' S, E., ALVEY, E., HARBERD, N. P., WIGGE, P. A. Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering. *Nature*, 2012, vol. 484, p. 242–246.

- LAKE, J. A., QUICK, W. P., BEERLING, D. J., WOODWARD, F. I. Plant development: signals from mature to new leaves. *Nature*, 2001, vol. 411, p. 154.
- LAKE, J. A., WOODWARD, F. I. Response of stomatal numbers to CO₂ and humidity: control by transpiration rate and abscisic acid. *New Phytologist*, 2008, vol. 179, p. 397–404.
- LAKE, J. A., WOODWARD, F. I., QUICK, W. P. Long-distance CO₂ signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 2002, vol. 53, no. 367, p. 183–193.
- LAWSON, T. Guard cell photosynthesis and stomatal function. *New Phytologist*, 2008, vol. 181, p. 13–34.
- LI, A.; ASSMANN, S. M.; ALBERT, R. Predicting essential components of signal transduction networks a dynamic model of guard cell abscisic acid signaling. *PLoS Biology* 2006, 4, e312.
- LIU, T., OHASHI-ITO, K., BERGMANN, D. C. Orthologs of Arabidopsis thaliana stomatal bHLH genes and regulation of stomatal development in grasses. *Development*, 2009, vol. 136, p. 2265–2276.
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods*, 2001, vol. 25, no. 4, p. 402–408.
- MACALISTER, C. A., OHASHI-ITO, K., BERGMANN, D. C. Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature*, 2007, vol. 445, p. 537–540.
- MIYAZAWA, S., LIVINGSTON, N. J., *et al.*, Stomatal development in new leaves is related to the stomatal conductance of mature leaves in poplar (*Populus trichocarpa* x *P. deltoides*). *Journal of Experimental Botany*, 2006, vol. 57, no. 2, p. 373–380.
- NADEAU, J. A., SACK, F. D. Control of stomatal distribution on the Arabidopsis leaf surface. *Science*, 2002, vol. 296, p. 1697–1700.

- OHASHI-ITO, K., BERGMANN, D. C. Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *The Plant Cell*, 2006, vol. 18, p. 2493–2505.
- PANTIN, F., MONNET GENTY B., F., JANNAUD, D., COSTA, J. M., RENAUD, J., MULLER, B., SIMONNEAU, T., GENTY, B. The dual effect of abscisic acid on stomata. 2013, vol. 197, p. 65–72.
- PEI, Z. M. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 2000, vol. 406, p. 731–734.
- PETERSON, K. M., RYCHEL, A. L., TORII, K. U. Out of the mouths of plants: The molecular basis of the evolution and diversity of stomatal development. *The Plant Cell*, 2010, vol. 22, p. 296–306.
- PILLITTERI, L. J., BOGENSCHUTZ, N. L., TORII, K. U. The bHLH protein, MUTE, controls differentiation of stomata and the guard cell pore in Arabidopsis. *Plant cell physiology*, 2008, vol. 49, no. 6, p. 934–943.
- PILLITTERI, L. J., PETERSON, K. M., HORST, R. J., TORII, K. U. Molecular profiling of stomatal meristemoids reveals new component of asymmetric cell division and commonalities among stem cell populations in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2011, vol. 23, p. 3260–3275.
- POOLE, I., LAWSON, T., WEYERS, J. D. B., RAVEN, J. A. Effect of elevated CO₂ on the stomatal distribution and leaf physiology of *Alnus glutinosa*. *New Phytologist*, 2000, vol. 145, p. 511–521.
- PROCHÁZKA, S. et al. *Fyziologie rostlin*. 1st ed. Praha: Academia, 1998.
- REYNOLDS-HENNE, Ch. E.; LANGENEGGER, A.; MANI, J.; SCHENK, N. Interactions between temperature, drought and stomatal opening in legumes. *Environmental and Experimental Botany* **2010**, 68, 37–43.
- RYCHEL, A. L., PETERSON, K. M., TORII, K. U. Plant twitter: ligands under 140 amino acids enforcing stomatal patterning. *Journal of plant research*, 2010, vol. 123, p. 275–280.
- SHIMADA, T., SUGANO, S. S., NISHIMURA, I., H. Positive and negative peptide signals control stomatal density. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2011, vol 68, p. 2081-2088.

- SHPAK, E. D., McABEE, J. M., PILLITTERI, L. J., TORII, K. U., Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. *Science*, 2005, vol. 309, no. 5732, p. 290–293.
- SCHLÜTER, U., MUSCHAK, M., BERGER, D., ALTMANN, T. Photosynthetic performance of an Arabidopsis mutant with elevated stomatal density (sdd1-1) under different light regimes. *Journal of Experimental Botany*, 2003, vol. 54, no. 383, p. 867–874.
- SCHOCH, P., ZINSOU, C., SIBI, M. Dependence of the stomatal index on environmental factors during stomatal differentiation in leaves of *Vigna sinensis* L.: 1. Effect of light intensity. *Journal of Experimental Botany*, 1980, vol. 31, p. 1211–1216.
- SUGANO, S. S., SHIMADA, T., IMAI, Y., OKAWA, K., TAMAI, A., MASASHI, M., HARA-NISHIMURA, I. Stomagen positively regulates stomatal density in Arabidopsis. *Nature*, 2010, vol. 463, no. 14, p. 241–246.
- TORII, K. U. Mix-and-match: ligand-receptor pairs in stomatal development and beyond. *Trends in plant science*, 2012, vol. 17, no. 12, p. 711–719.
- TORII, K. U., MITSUKAWA, N., OOSUMI, T., MATSUURA, Y., YOKOYAMA, R., WHITTIER, R. F., KOMEDA, Y. The Arabidopsis ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell*, 1996, vol. 8, p. 735–746.
- TRICKER, P. J., GIBBINGS, J. G., RODRIGUEZ LÓPEZ, C. M., HADLEY, P., WILKINSON, M. Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *Journal of Experimental Botany*, 2012, vol. 63, no. 10, p. 3799–3814.
- VATÉN, A., BERGMANN, D. C. Mechanisms of stomatal development: an evolutionary view. *EvoDevo*, 2012, 3:11.
- VISWANATHAN, Ch., OHTA, M., KANRAR, S., LEE, B., HONG, X., AGARWAL, A., ZHU, J. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes & Development*, 2003, vol. 17, p. 1043–1054.

VON GROLL, U., ALTMANN, T. Stomatal cell biology. *Current Opinion in Plant Biology*, 2001, vol. 4, p. 555–560.

VON GROLL, U., BERGER, D., ALTMANN, T. The subtilisin-like serine protease SDD1 mediates cell-to-cell signaling during Arabidopsis stomatal development. *The Plant Cell*, 2002, vol. 14, p. 1527–1539.

WANG, H., NGWENYAMA, N., YIDONG, L., WALKER, J. C., ZHANG, S. Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen activated protein kinases in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2007, vol. 19, p. 63–73.

WILKINSON, S., DAVIES, W. J. ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment*, 2002, vol. 25, p. 195–210.

WILLMER, C., FRICKER, M. *Stomata*. 2nd ed. London: Chapman&Hall, 1996. ISBN 0 412 57430 6.

WOODWARD, F. I. Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre industrial levels. *Nature*, 1987, vol. 327, p. 617-618.

WOODWARD, F. I., KELLY, C. K. The influence of CO₂ concentration on stomatal density. *New Phytologist*, 1995, vol. 131, p. 311–327.